

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE DES CORTICOSTÉROÏDES PAR OXYDATION BISMUTHIQUE

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté
et du Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital de l'Antiquaille.

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

le 24 Juin 1960

PAR

Jean-Max BURLET

Né le 21 Avril 1935, à Ste-Foy-lès-Lyon (Rhône).

IMPRIMERIE DE TREVOUX

J. PATISSIER

1960

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU DOSAGE DES CORTICOSTÉROÏDES
PAR OXYDATION BISMUTHIQUE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DOSAGE DES CORTICOSTÉROÏDES PAR OXYDATION BISMUTHIQUE

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté
et du Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital de l'Antiquaille.

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

le 24 Juin 1960

PAR

Jean-Max BURLET

Né le 21 Avril 1935, à Ste-Foy-lès-Lyon (Rhône).

IMPRIMERIE DE TREVoux

J. PATISSIER

1960

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen Honoraire	M. J. LÉPINE
Doyen (Correspondant de l'Institut)	M. H. HERMANN
Assesseur	M. M. LEVRAT

Professeurs Honoraires

MM. NICOLAS, COLLET, GUIART, CADE, PATEL, LÉPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATÉ, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

Physiologie	HERMANN	Clinique stomatologique	DUCLOS
Clinique urologique	CIBERT	Clin. médicale infantile et hygiène du 1 ^{er} âge	BERNHEIM
Physique biol., radio-logie et physiothérapie	PONTHUS (déta ché à Beyrouth)	Biologie médicale et pharmacodynamie	JOURDAN
Clin. neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME	Botan. et cryptogamie	NÉTIEN
Thérapeutique chirurg. et chirurgie opératoire	ROCHET	Clinique chirurgicale	BERTRAND
Clin. des maladies infec-tieuses et bactériologie	X....	Chimie analytique phar-maceutique	BADINAND
Chimie organique et toxico-logie	CHAMBON	Pharmacie et pharmacol. Méd. légale et déontologie	DREVON
Clinique chirurgicale	WERTHEIMER	Parasitologie et patholo-gie exotique	ROCHE
Hydrologie thérap., cli-matol. et écologie sociale	DELORE	Clinique oto-rhino-laryn-gologique	COUDERT
Clinique médicale	P.-RAVAULT	Clinique ophtalmologique	MOUNIER-KUHN
Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT	Clinique dermatologique et syphiligraphique	PAUFIQUE
Clinique médicale	CROIZAT	Clinique de pneumo-phti-siologie	THIERS
Chimie biol. et médic. Clinique chirurgicale	ENSELME	Traumatol. des membres	BRUN
Clin. de chirurgie ortho-pédique et chir. infant. Pharmacie galénique et matière médicale	MALET-GUY	Cancérologie	CREYSSEL J.
Clinique gynécologique	GUILLEMINET	Anatomie pathologique	DARGENT
Clinique obstétricale	REVOL	Pathologie gén. et expér. Anatomie	GUICHARD
Médecine du Travail	POLOSSON	Pathologie chirurgicale	GIRARD P.
Clinique médicale	PIGEAUD	Thérapeutique	LATARJET
Hygiène et action sani-taire et sociale	BOURRET	Pathologie médicale	PEYCELON
	LEVRAT	Physio-pathologie des voies respiratoires	GIRARD M.
	SOHIER	Histologie	VACHON
			GALY
			KEHL

Professeur à titre personnel

Physique nucléaire appliquée à la médecine..... M BERGER

Professeurs titulaires sans chaire

Obstétrique	BANSSILLON	Physiologie	CHATONNET
Parasitologie	ROMAN	Pharmacie galénique et matière médicale	DORCHE
Bactériologie	BEKTOYF A.		
Physiologie	CIER J. F.		

Maîtres de Conférences - Agrégés

Chimie organique et toxico-logie	PERROT	Thérapeutique	BRETTE
Anatomie pathologique	FEROLDI	Histologie	DUMONT L.
Pharmacie et Pharmacol. Chimie biologique et mé-dicale	CIER A.	Hygiène	THIVOLET
Anatomie	CREYSSEL R.	Parasitologie	GARIN J.-P.
	DUROUX	Physique	MORET
		Botanique et Cryptoga-mie	ODDOUX

Agrégés en exercice

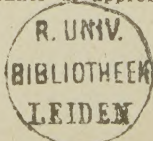
Neuro-chirurgie	LEQUIRE	Maladies infectieuses	MONNET P.
Cardiologie	GONIN A.	Oto-Rhino-Laryngologie	GIGNOUX M.
Obstétrique	MATHIEU J.	Stomatologie	FREIDEL Ch.
Orthopédie	MARION J.	Médecine générale	PLAUCHU M.
Propédeutique médicale	PONT M.	Pathologie médicale	DEVIC M.
Pathologie médicale	VIGNON G.	Médecine légale	COLIN M.
Pathologie médicale	REVOL L.	Neurologie	GUYOTAT J.
Pathologie chirurgicale	JAUBERT DE BEAUJEU	Obstétrique	DUMONT M.
Médecine générale	TRAEGER J.	Urologie	DURAND L.
Pathologie chirurgicale	GUILLEMIN G.	Chirurgie générale	FRANCILLON
Electro-radiologie	PAPILLON J.	Médecine générale	DESPERIERES C.
Obstétrique	BURTHIAULT	Chirurgie générale	DE MOURGUES
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS R.	Chirurgie générale	SAUBIER E.
Médecine générale	GUINET P.	Dermatologie	COLOMB D.
Pathologie chirurgicale	SAUTOT J.	Médecine du travail	TOLOT F.
Chirurgie générale	MARION P.	Neurol. et Psychiatrie	SCHOTT B.
Chirurgie générale	MICHAUD P.	Ophtalmologie	BONAMOUR G.

Examineurs de la Thèse :

M. BADINAND, *Président*.

MM. CHAMBON, REVOL, GUINET, *Assesseurs*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A MES GRANDS-PARENTS

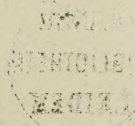
A MES PARENTS

Ils m'ont toujours entouré de leur affection. Ce sont leur exemple et leurs enseignements qui m'ont guidé vers la Pharmacie.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection et de ma gratitude.

A MES FRERES ET SŒURS

A TOUS LES MIENS



A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BADINAND

PROFESSEUR DE CHIMIE ANALYTIQUE
PHARMACIEN DES HÔPITAUX

Il nous a accueilli avec bienveillance dans ses laboratoires, à l'Hôpital et à la Faculté.

Il a dirigé notre travail avec la même bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CHAMBON

Nous avons commencé notre Internat dans son service hospitalier. Il nous fait le grand honneur de juger ce travail.

Nous l'assurons de notre respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. REVOL

Il nous a toujours témoigné beaucoup de sollicitude, et a bien voulu s'intéresser à notre travail.

Nous l'en remercions bien respectueusement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. GUINET

Il a toujours montré beaucoup d'intérêt pour ce travail, et nous a accueilli avec bienveillance dans son service de l'Hôpital de l'Antiquaille.

Nous l'en remercions bien sincèrement.

A MONSIEUR RENÉ MALLEIN

PHARMACIEN DES HÔPITAUX
CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ

Il a bien voulu nous permettre de continuer dans son laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital de l'Antiquaille le travail entrepris. Il s'est intéressé à nos recherches et nous a utilement conseillé.

Nous le prions de croire à notre reconnaissance.

A MONSIEUR ANDRÉ REVOL

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ

Il a bien voulu nous permettre d'utiliser des résultats antérieurs. Au cours de ce travail, il nous a amicalement prodigué son aide, ses conseils éclairés et ses encouragements.

Nous l'assurons de notre reconnaissance et de notre amitié.

A MES CAMARADES
DE L'INTERNAT EN PHARMACIE

Introduction

L'étude des sécrétions endocrines entièrement dominée à ses débuts par les méthodes biologiques fait appel actuellement, — sauf pour quelques hormones hypophysaires — aux méthodes chimiques.

Dans le cadre de l'exploration de la fonction cortico-surrénalienne, les dosages chimiques des corticostéroïdes urinaires donnent une idée assez précise de l'état de la sécrétion surrénalienne. Deux difficultés se présentent entre autres, dans l'interprétation des résultats :

— Un même stéroïde physiologique peut aboutir à des métabolites urinaires nombreux et variés,

— le même stéroïde urinaire peut provenir d'hormones différentes par leur activité physiologique.

Ainsi, le premier des dosages couramment employés, celui des 17-Cétostéroïdes urinaires évalue un ensemble de composés qui représentent en proportions variables, les métabolites de différents groupes d'hormones stéroïdes : glucocorticoïdes, androgènes surrénaliens, hormones sexuelles.

Par la suite de nombreuses méthodes ont été proposées pour le dosage des corticostéroïdes à 21 atomes de carbone.

La méthode d'HEARD et SOBEL (1946) reposant sur la réduction du réactif phosphomolybdique puis la méthode de DAUGHADAY (1948) où l'on dose l'aldéhyde formique obtenu après oxydation périodique du groupement alcoolique, furent utilisées. On s'adresse surtout actuellement à la méthode proposée par PORTER et SILBER (1950) : l'urine est hydrolysée par la glycuronidase en milieu acide à l'étuve à 37° pendant 24 heures ; après extraction chloroformique, l'extrait est additionné de phénylhydrazine en milieu sulfurique. La coloration jaune obtenue est lue au spectrophotomètre à 410 millicrons.

Comme nous le voyons, certaines de ces méthodes sont très spécifiques d'un groupement chimique déterminé, mais il est rare que cette spécificité chimique corresponde à la to-

talité d'une sécrétion physiologique définie. C'est ainsi que la méthode de PORTER dose les stéroïdes à chaîne latérale de dihydroxy-acétone ; mais on sait actuellement que ces corps, s'ils dérivent tous du cortisol ne représentent qu'une fraction assez faible des métabolites de cette hormone.

Au laboratoire de la pharmacie de l'Hôpital de l'Antiquaille sous la direction de Monsieur le Professeur BADINAND, puis de Monsieur MALLEIN, Pharmacien des Hôpitaux, le dosage des 17-cétostéroïdes et le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes par la méthode de PORTER étaient employés déjà depuis plusieurs années. La présence d'un service spécialisé en endocrinologie dirigé par Monsieur le Docteur GUINET avait nécessité la mise au point de ces méthodes.

A la suite de Monsieur A. REVOL, nous nous sommes intéressés à une méthode publiée, en 1955, par NORIMBERSKI.

Après réduction par le borohydrure de sodium suivie d'une oxydation par le bismuthate de sodium on procède à une extraction des 17-cétostéroïdes formés et à leur dosage par la réaction de ZIMMERMANN.

Cette méthode paraissait présenter deux avantages :

- ne doser que les métabolites du cortisol et de ses précurseurs ;
- doser la plus grande partie des métabolites.

Nous avons étudié cette méthode sous deux aspects qui seront envisagés successivement dans cet exposé :

1° Nous l'avons appliquée au dosage des corticostéroïdes urinaires chez un certain nombre de sujets hospitalisés dans le service du Docteur GUINET, et nous essayerons de voir quels renseignements elle peut apporter.

2° Nous avons essayé aussi, d'un point de vue plus strictement chimique, de préciser l'étude des différents temps des réactions mises en œuvre, dont certains aspects ne nous ont pas paru entièrement élucidés par les travaux antérieurs.

Les constatations que nous avons faites serviront de base pour la discussion, d'une part de la valeur d'ensemble de la méthode appliquée à la biologie, d'autre part, pour chaque réaction mise en œuvre, des facteurs susceptibles de l'influencer et des effets qu'on peut en attendre.

Avant d'aborder notre sujet, et d'envisager le dosage des corticostéroïdes, il semble nécessaire de situer le problème par un rappel des connaissances actuelles sur la sécrétion cortico-surrénalienne.

Plan du Travail

PREMIERE PARTIE

I. LA SÉCRÉTION CORTICO-SURRÉNALIENNE :

- Les gluco-corticoïdes.
- Les minéralo-corticoïdes.
- Les androgènes.
- Biosynthèse des corticostéroïdes.
- Métabolisme et élimination urinaire des corticostéroïdes.
- Les corticostéroïdes urinaires.

II. RÉACTIONS ANALYTIQUES ET MÉTHODES DE DOSAGE DES CORTICOSTÉROÏDES URINAIRES :

- Réactions analytiques des corticostéroïdes.
- Méthodes de dosage des corticostéroïdes urinaires.

DEUXIEME PARTIE

I. LES MÉTHODES DE NORYMBERSKI :

- Dosage des stéroïdes 17-cétogènes.
- Dosage des 17-hydroxy-corticostéroïdes totaux.
- Dosage des 21-désoxy-cétols.
- Détermination des stéroïdes à chaîne de dihydroxy-acétone.
- Dosage du prégnanetriol.
- Modifications proposées à ces méthodes.

II. TECHNIQUES PERSONNELLEMENT UTILISÉES :

- Dosage des 17-CS.
- Dosage des chromogènes Porter et Silber.
- Dosage des 17-KGS.
- Dosage des 17-OH CS totaux.

III. RÉSULTATS OBTENUS DANS LES DOSAGES URINAIRES :

- Etude statistique des résultats.
- Interprétation des résultats.

TROISIEME PARTIE

I. LE BOROHYDRURE ET LE BISMUTHATE :

- Les borohydrures alcalins.
- Le bismuthate de sodium.

II. ETUDE DE L'ACTION DU BOROHYDRURE DE SODIUM :

- Action sur la fonction cétone en 17.
- Action sur la fonction cétone en 20.
- Action sur la fonction cétone en 3.
- Action sur les stéroïdes urinaires.

III. ETUDE DE L'ACTION DU BISMUTHATE DE SODIUM :

- Définition du réactif, dosages.
- Etude qualitative de l'oxydation des stéroïdes purs.
- Etude quantitative de l'oxydation des stéroïdes purs.
- Etude cinétique de l'action du bismuthate sur les stéroïdes purs.
- Oxydation bismuthique des extraits urinaires.
- Action du bismuthate en milieu urinaire.
- Action du bismuthate sur les fonctions hydroxylées en 3 et en 20.
- Résumé de l'action du bismuthate.

IV. ETUDE DE LA RÉACTION AU BOROHYDRURE-BISMUTHATE :

- Action qualitative sur les stéroïdes purs.
- Action quantitative sur les stéroïdes purs.
- Action sur les extraits urinaires.

V. ETUDE DES CAUSES D'ERREURS :

- Qualité des réactifs.
- Existence d'une glycosurie importante.
- Autres causes d'erreurs.
- Conclusions.

QUATRIEME PARTIE — DISCUSSION

- Action du bismuthate sur les stéroïdes purs.
- Action du borohydrure-bismuthate sur les stéroïdes purs.
- Technique proposée.

Conclusions.

PREMIÈRE PARTIE

I. La sécrétion cortico-surrénalienne

Nos connaissances sur la sécrétion cortico-surrénalienne sont d'acquisition récente. En effet, ADDISON en 1855 sut montrer que la maladie qui porte maintenant son nom est due à une altération des capsules surrénales, et BROWN-SÉQUARD l'année suivante démontra sur l'animal que la sur-rénalectomie totale est incompatible avec la vie ; mais il fallut attendre 1922 pour que HOUSSAY et LEWIS établissent que c'est la seule partie corticale des glandes qui est indispensable à la vie. La chimie des stéroïdes débute à ce moment avec les travaux de BUTENANDT, DOISY, LAQUEUR, MARRIAN, ZONDECK, GIRARD, WIELAND, WINDAUS, DIELS, BERNAL. Enfin, en 1934, les équipes de KENDALL et WINTERSTEINER aux États-Unis, celle de REICHSTEIN en Suisse entreprennent l'étude chimique systématique des corticostéroïdes. En 1936, la première hormone cortico-surrénale, la corticostérone, est isolée par KENDALL.

Actuellement, une quarantaine de corticostéroïdes ont pu être isolés et identifiés à partir des extraits de glandes broyées et homogénéisées, dans les perfusats de surrénales de bovidés, ou dans le sang veineux surrénalien. Ces corps sont classés selon leurs propriétés physiologiques en trois grands groupes : gluco-corticoïdes, minéralo-corticoïdes et androgènes.

LES GLUCOCORTICOIDES

Les gluco-corticoïdes sont quantitativement les éléments les plus importants de la sécrétion cortico-surrénalienne. Nous ne signalerons que les principaux, qui sont le cortisol (hydrocortisone, composé F de Kendall, 17-hydroxy-corticostérone ou tri-hydroxy-11,17,21-dicéto-3,20-prégnène-4 (1), la corticostérone (composé B, di-hydroxy-11,21-dicéto-3,20-

(1) Dans la suite de l'exposé, nous désignerons par leur nom commun le cortisol, la cortisone, la corticostérone et la cortexone. Les autres stéroïdes seront désignés par leur nom chimique, conformément aux règles de nomenclature publiées dans le *Bull. Soc. Chim. France*, 1958, fascicule 10, p. 203-270.

prégnène-4), la cortisone (composé E de Kendall, 17 α -hydroxy-11-déhydro-corticostérone, di-hydroxy-17,21-tricéto-3,11,20-prégnène-4) et la 11-déhydro-corticostérone (composé A de Kendall, hydroxy-21-tricéto-3,11,20-prégnène-4). Les proportions de ces composés varient d'une espèce animale à l'autre. Chez l'Homme, le cortisol est de beaucoup le plus abondant, et constitue avec la corticostérone les 9/10 de la sécrétion gluco-corticoïde. La présence de cortisone dans le sang veineux surrénalien n'est pas établie avec certitude. La quantité totale de stéroïdes α -cétoïques sécrétés est évaluée à plus de 30 mg par jour.

LES MINERALOCORTICOÏDES

Les minéralo-corticoïdes, doués d'une activité physiologique intense, sont sécrétés en très faibles quantités. Pendant longtemps on a ignoré quel était le minéralo-corticoïde physiologique. La cortexene (D.O.C., 11-dé-oxy-corticostérone, hydroxy-21-dicéto-3,20-prégnène-4) et le composé S de Reichstein (11-désoxy-cortisol, dihydro-17,21-dicéto-3,20-prégnène-4), dont on admet l'existence comme intermédiaires de la biosynthèse du composé B et du cortisol, n'ont pas pu être caractérisés avec certitude dans le sang veineux surrénalien. L'aldostérone (électrocortine, di-hydroxy-11,21-dicéto-3,20-al-18-prégnène-4 en équilibre avec sa forme héli-acétalique) est actuellement considérée comme l'hormone minéralotrope physiologique ; son importance quantitative est très faible, puisque sa sécrétion journalière se chiffre en microgrammes.

LES ANDROGÈNES

Les androgènes surrénaliens sont des 17-cétostéroïdes (donc des corps à 19 atomes de carbone) que l'on a pu caractériser dans le sang veineux surrénalien, et qui sont doués d'une activité androgénique. Ce sont la déhydro-épi-androstérone (trans-déhydro-androstérone, dicéto-3,17-androstène-5), la Δ_4 -androstène-dione (dicéto-3,17-androstène-4), l'adrénostérone (1) (tricéto-3,11,17-androstène-4), et la 11 β -hydroxy-androstène-dione (hydroxy-11-dicéto-3,17-androstène-4).

BIOSYNTHÈSE DES CORTICOSTÉROÏDES

La chaîne des réactions biologiques qui conduisent aux corticostéroïdes est actuellement connue de façon assez pré-

(1) Par la suite, l'adrénostérone sera désignée par son nom commun.

cise à la suite de nombreux travaux basés d'une part sur la perfusion systématique des précurseurs présumés à travers des surrénales de bovidés, ou l'incubation de ces corps avec des fragments ou des broyats de glande surrénale, et d'autre part sur l'utilisation de corps marqués par le carbone 14 ou le tritium. On a pu ainsi établir qu'il existe deux voies différentes de synthèse des corticostéroïdes. L'une passe par l'intermédiaire du cholestérol (41) qui est scindé en Δ_5 -prégnénolone (36-51), et ensuite transformé en progestérone. A partir de la progestérone peuvent se former les principaux corticostéroïdes par deux chaînes de réactions : l'une conduisant directement à la cortexone puis à la corticostérone, l'autre conduisant au cortisol par l'intermédiaire de la 17-hydroxy-progestérone puis du 11-désoxy-cortisol (26). On discute encore de l'ordre dans lequel se font les hydroxylations en position 17 et 21. Quoiqu'il en soit, on est bien certain que la 11 β -hydroxylation intervient en dernier, et que lorsqu'elle est accomplie aucune autre hydroxylation ne peut plus se produire. Toutes ces réactions sont conditionnées par les systèmes enzymatiques des glandes surrénales, et sous le contrôle de la corticostimuline hypophysaire.

Il existe, nous l'avons dit, une deuxième voie de synthèse des corticostéroïdes, qui, elle, ne passe pas par l'étape intermédiaire du cholestérol, et n'est pas sous la dépendance de la sécrétion d'A.C.T.H. : c'est la synthèse directe des corticostéroïdes à partir des maillons acétates (25).

Divers états pathologiques s'accompagnent du blocage de l'un des systèmes enzymatiques hydroxylants de la cortico-surrénale, et peuvent modifier la sécrétion hormonale : c'est le cas des syndromes surréno-génitaux, où le blocage de l'hydroxylation en 21 entraîne une production anormalement élevée de 17-hydroxy-progestérone, et des hyperplasies surrénales où, la 11 β -hydroxylation ne se faisant pas, on assiste à la production de 11-désoxy-cortisol.

MÉTABOLISME ET ÉLIMINATION URINAIRE DES CORTICOSTÉROÏDES

Les hormones sécrétées par la surrénale sont déversées dans la circulation générale par la veine surrénale. Tous les tissus interviennent alors dans leur métabolisme, et spécialement le foie et le rein. Les stéroïdes sanguins sont pour moitié sous forme glycurono-conjuguée, et de toutes façons étroitement liés aux protéines sanguines. Le métabolisme tissulaire agit sur les corticostéroïdes pour les éliminer par

deux voies : dégradation en dérivés moins actifs, et conjugaison en dérivés solubles plus facilement éliminés.

L'inactivation tissulaire peut se faire de diverses façons, en général valables pour tous les corticostéroïdes. Les tissus sont d'abord susceptibles de modifier l'équilibre des formes 11-cétoniques et 11 β -hydroxylées. Ils interviennent surtout sur le cycle A et sur la chaîne latérale portée par le carbone 17. Nous avons vu que tous les corticostéroïdes portent sur le noyau A un groupement Δ_4 -3-cétone : la dégradation tissulaire conduit d'abord à la saturation de la double-liaison, puis à la réduction du groupement cétonique en alcool secondaire (62). Quant à la chaîne latérale des corticostéroïdes, elle représente un point particulièrement fragile de la molécule. Le groupement cétonique en 20 est facilement réduit par les systèmes enzymatiques en dérivé 20-hydroxylé *cis* ou *trans*. La fonction alcool primaire portée par le carbone 21 peut être réduite avec formation d'un reste méthyle terminal (64). Enfin, les stéroïdes 17-hydroxylés peuvent subir *in vivo* la rupture oxydative avec formation de 17-cétostéroïde (11).

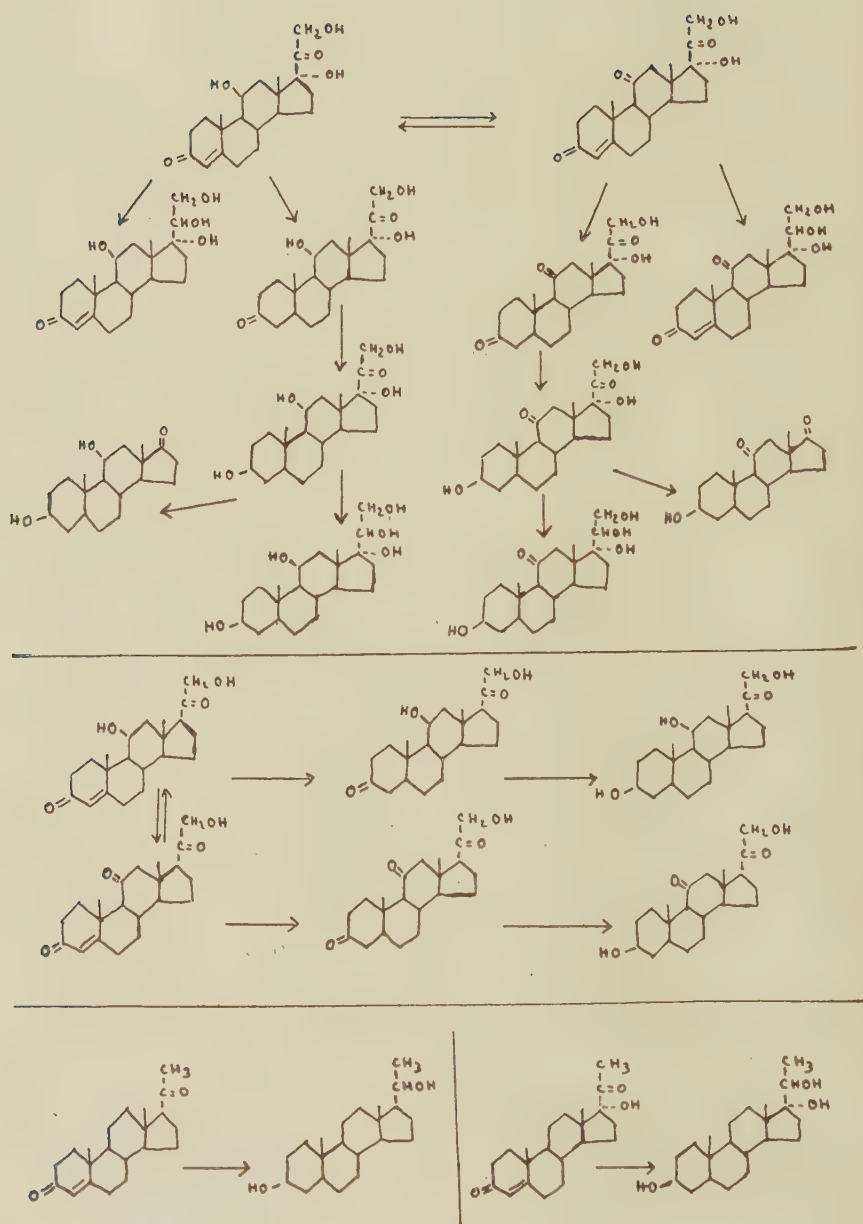
L'élimination des stéroïdes met d'autre part en jeu les mécanismes hépatiques de conjugaison, qui s'appliquent aux stéroïdes à 21 atomes de carbone et à leurs catabolites à 19 atomes de carbone, de façon différente selon la position spatiale de l'hydroxyle en 3 : les 3 α -stéroïdes conduisent surtout à des dérivés glycurono-conjugés, alors que les 3 β -stéroïdes conduisent exclusivement à des dérivés sulfo-conjugés (37-33). Finalement, on retrouvera dans l'urine des stéroïdes libres en très petite quantité, des stéroïdes sulfo-conjugés en proportions généralement assez faibles (19) sauf quelques cas pathologiques d'élimination élevée de déhydro-épi-androstérone, et surtout des glycurono-conjugés. La nature même de ces stéroïdes dépendra des hormones dont ils dérivent.

LES CORTICOSTÉROÏDES URINAIRES

L'urine contient des 17-cétostéroïdes : androgènes surrénaliens et leurs métabolites, métabolites des 17-hydroxycorticostéroïdes (ce sont surtout des métabolites du cortisol et de la cortisone, 17-cétostéroïdes 11-oxygénés : 11 β -hydroxy-étiocholanolone et 11-céto-étiocholanolone, 11 β -hydroxy-androstérone et 11-céto-androstérone) auxquels s'ajoutent des 17-cétostéroïdes d'origine gonadique. Les corticostéroïdes sont cependant éliminés de façon prédominante sous forme de métabolites à 21 atomes de carbone.

Le cortisol et la cortisone qui en dérive par transformation dans les tissus du groupement 11 β -hydroxylé en groupement cétonique sont éliminés en nature pour une faible part. En fait, les formes d'élimination prédominantes sont les dérivés tétra- et hexa-hydrogénés, ayant ou non subi la réduction de la fonction cétone en position 20 (21). La corticostérone subit des transformations identiques. Les stéroïdes pathologiques, qui ne sont sécrétés en quantités importantes qu'en cas de perturbation des systèmes enzymatiques de la surrénale, peuvent contribuer à une excrétion massive des corticostéroïdes sous des formes différentes : La 17-hydroxy-progestérone s'élimine principalement sous forme de trihydroxy-3,17,20-prégnane (31). Les principaux métabolites urinaires des corticostéroïdes normaux (cortisol et corticostérone) et pathologiques (progestérone et 17-hydroxy-progestérone des syndromes surrénogénitaux) sont représentés dans le tableau I.

On remarque que, dans la série des corps à 21 atomes de carbone (qui représentent la forme d'élimination la plus importante des corticostéroïdes vrais : minéralo- et glucocorticoïdes), les substituants oxygénés en positions 3, 11, 20 et 21 peuvent subir diverses modifications. Par contre la fonction 17-hydroxylée est toujours respectée par les réactions cataboliques de l'organisme. Or le groupe chimique caractérisé par le groupement hydroxyle en 17 correspond à un groupe physiologique défini : de tels stéroïdes ne peuvent provenir que du métabolisme du cortisol et de ses précurseurs. Ainsi donc, le dosage des 17 α -hydroxy-corticostéroïdes urinaires réalisé par la méthode de Norymberski évalue de façon très spécifique les métabolites des hormones glucocorticoïdes.



TABEAU I

II. Réactions analytiques et méthodes de dosage des cortico-stéroïdes urinaires

Les 17-cétostéroïdes (1) donnent diverses réactions parmi lesquelles la réaction de Zimmermann (coloration violette en présence de méta-dinitro-benzène en milieu potassique) est actuellement à peu près seule retenue pour les dosages, après hydrolyse et extraction par un solvant organique approprié, ou éventuellement après séparation chromatographique des diverses fractions. Nous ne nous étendrons pas sur les propriétés analytiques des 17-cétostéroïdes. Nous rappellerons avec plus de détails les principales réactions des stéroïdes à 21 atomes de carbone en nous inspirant d'une publication de Messieurs A. BADINAND et A. REVOL (3), et les méthodes proposées pour le dosage de ces corticostéroïdes dans l'urine.

RÉACTIONS ANALYTIQUES DES CORTICOSTÉROÏDES

Caractères physiques généraux.

Au cours de l'isolement d'un stéroïde en quantités importantes, ses constantes physiques (point de fusion, pouvoir rotatoire) permettront de le caractériser. L'analyse polarographique pourra être appliquée aux stéroïdes cétoniques combinés au réactif T de Girard (60). En biologie, on ne dispose généralement que de quantités très faibles de produit, et on préfère les méthodes de spectroscopie d'absorption, qui exigent beaucoup moins de stéroïde.

Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la solution méthanolique révèle surtout les double-liaisons conjuguées du groupement Δ^4 -3-cétone (maximum d'absorption à 240 m μ).

En milieu sulfurique, les stéroïdes donnent des chromogènes dont les spectres ont été étudiés par ZAFFARONI et

(1) Par la suite, nous emploierons souvent pour désigner les 17-cétostéroïdes l'abréviation classique 17-CS.

BERNSTEIN (68-8) et sont souvent plus spécifiques que les spectres des solutions méthanoliques.

Le spectre d'absorption dans l'infra-rouge est, lui, une constante de la molécule qui peut en permettre l'identification formelle. Le recours à cette méthode particulièrement intéressante est malheureusement limité par le coût extrêmement élevé de l'appareillage.

Réactions des groupements carbonyles.

— Le méta-dinitro-benzène en milieu potassique qui donne une coloration violette avec les 17-cétones donne une coloration bleue avec les cétones en 3, et brune avec les cétones en 20.

— Le réactif T de Girard réagit avec les corticostéroïdes, et le groupement ammonium quaternaire peut alors être caractérisé par le réactif de Dragendorff.

— La réaction de Legal au nitroprussiate est positive avec les groupements cétoniques α - β insaturés des Δ_4 -3 céto-stéroïdes.

— La formation de semi-carbazones est possible.

— Les Δ_4 -3-cétones donnent les hydrazones colorées en jaune avec l'isonicotyl-hydrazide (63). D'autres hydrazides sont susceptibles de réagir de façon analogue, notamment la salicyl-hydrazide (14).

— Les groupements cétoniques en 3, 6, 7, 12, 16 et 20 réagissent avec la dinitro-phényl-hydrazine (45-46).

— Les 3-cétones réagissent avec le 2,6-diterbutyl-paracrésol de façon différente selon que le noyau A est saturé ou non, et dans ce cas, selon la position de la double-liaison (6).

Réactions des groupements hydroxyles.

Les groupements hydroxyles sont susceptibles de former des esters : hémiphtallates titrables par la soude (Dobriner), 3,5-dinitro-phtallates violets en milieu alcalin (Engel), dinitrobenzoates violets en milieu potassique (Kellie).

Réactions de la chaîne latérale.

L'oxydation périodique de Malaprade s'applique aux chaînes polyoxygénées et libère du formol qui donne une réaction caractéristique avec l'acide chromotropique.

— La réaction de Porter et Silber (42) à la phényl-hydrazine sulfurique est spécifique de la chaîne latérale 17,21-dihydroxy-20-cétone.

— La chaîne latérale est probablement responsable aussi de réactions communes aux stéroïdes et aux sucres, comme la réaction à l'anthrone sulfurique.

Réactions de réduction.

La molécule stéroïde est réductrice, surtout par sa chaîne latérale voisine de la structure des sucres, vis-à-vis de divers réactifs : sels de cuivre, nitrate d'argent ammoniacal, permanganate de potassium, solutions iodo-iodurées, sels de tétrazolium, notamment.

Réaction aux divers acides.

Nous avons déjà mentionné l'intérêt de la spectroscopie de la solution sulfurique. Les acides phosphorique, paratoluène-sulfonique, trichloracétique peuvent aussi donner avec les stéroïdes diverses réactions d'halochromie ou d'halofluorie.

Toutes ces réactions trouvent de nombreuses applications dans l'identification des stéroïdes séparés généralement par chromatographie, soit pour la révélation des chromatogrammes, soit pour la caractérisation de produits élués des chromatogrammes. Plusieurs de ces réactions ont aussi été appliquées au dosage des corticostéroïdes.

MÉTHODES DE DOSAGE DES CORTICOSTÉROÏDES URINAIRES

En raison du nombre assez grand de stéroïdes susceptibles d'être éliminés dans l'urine, de nombreuses méthodes de dosage ont été proposées, qui mettent à profit les propriétés réactionnelles de différents groupements de ces molécules. Ces méthodes sont par conséquent plus ou moins spécifiques d'une structure chimique particulière. Les méthodes de dosage des corticostéroïdes à 21 atomes de carbone font toutes appel à la réactivité spéciale de la chaîne latérale portée par le carbone 17. Nous les classerons en trois groupes :

- méthodes basées sur les propriétés réductrices de la molécule ;
- méthodes par formation d'hydrazones ;
- rupture oxydative de la molécule.

Dans chaque groupe, nous citerons les principales méthodes à titre d'exemple, sans prétendre les nommer toutes.

Méthodes basées sur les propriétés réductrices de la molécule.

Ces méthodes furent parmi les premières utilisées. Mais les propriétés réductrices ne sont pas caractéristiques des

corticostéroïdes, et les méthodes qui en découlent sont peu spécifiques. L'action réductrice est susceptible de s'exercer vis-à-vis de sels cupriques selon TALBOT (61), d'un réactif phospho-molybdique selon HEARD et SOBEL (24), d'un sel de tétrazolium selon CHEN et coll. (13). Les méthodes par réduction d'un réactif phospho-molybdique et par réduction d'un sel de tétrazolium ont fait l'objet récemment d'une étude critique et d'une comparaison avec les méthodes de PORTER et SILBER et de NORZYMSKI (44), sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir. Enfin, tout récemment, PESEZ et ROBIN ont proposé la réduction de la para-nitroso-diméthyl-aniline, qui par copulation ultérieure avec un phénol donne une réaction colorée (40).

Méthodes par formation d'hydrazones.

GORNALL et MAC DONALD préconisent la réaction à la 2,4-dinitro-phényl-hydrazine (23) qui est spécifique des groupements cétoniques ; mais les stéroïdes cétoniques peuvent avoir des origines et des significations très différentes. L'emploi d'un réactif phényl-hydrazine sulfurique selon PORTER et SILBER (42) permet de doser spécifiquement les molécules à chaîne latérale de di-hydroxy-acétone ; on dose par cette méthode la cortisone, le cortisol, et leurs dérivés tétrahydrogénés ; on ne dose donc qu'une fraction des métabolites de ces stéroïdes. Enfin, pour les deux méthodes, divers corps cétoniques (sucres ou médicaments) peuvent fausser le dosage.

Rupture oxydative de la molécule.

La chaîne latérale polyoxygénée confère à la molécule stéroïde une fragilité particulière au niveau du carbone 17 ou du carbone 20. Divers oxydants ont été préconisés pour réaliser la fission à ce niveau.

WILSON, FAIRBANKS et KRAMER (66) réalisent l'oxydation par l'acide chromique, et obtiennent un 17-cétostéroïde ; mais l'oxydation chromique, trop brutale, risque d'altérer les substituants du noyau stéroïde. Le tétracétate de plomb, essayé par REICHSTEIN (47) pour l'oxydation des stéroïdes donne des résultats peu satisfaisants.

L'acide periodique, dont MALAPRADE puis FLEURY et COURTOIS ont bien montré l'intérêt pour la rupture oxydative des chaînes polyoxygénées, a été utilisé dans l'analyse des corticostéroïdes par LOWENSTEIN, CORCORAN et PAGE (35), DAUGHADAY et coll. (15), DESGREZ et coll. (16) : la réaction ne conduit à une cétone en 17 que si elle s'applique à un 17-20 glycol : la chaîne latérale est oxydée en formol, ou dans le

cas d'un 21-désoxy-17,20-glycol en acétaldéhyde ; ce sont ces aldéhydes qu'il faut finalement doser, et non le reste stéroïde. NORYMBERSKI, reprenant ces travaux, et ceux de HEIDT, GLADDING et PURVES (27) sur le clivage des glycols, voit dans le bismuthate de sodium l'oxydant de choix pour la rupture oxydative des chaînes latérales des corticostéroïdes (10).

En effet, le potentiel d'oxydo-réduction du bismuthate de sodium se situe entre ceux du tétracétate de plomb et de l'acide periodique. Selon NORYMBERSKI, ce réactif est susceptible d'oxyder les 17-20 glycols et les 17-20 cétols avec formation quantitative des 17-cétostéroïdes, qu'il est facile d'évaluer par la réaction de Zimmermann. Cependant les 21-désoxy-17-20-cétols échappent à l'oxydation dans ces conditions. APPLEBY et coll. (1) montrent qu'il est néanmoins possible d'atteindre cette série de stéroïdes en faisant précéder l'oxydation bismuthique d'un temps de réduction par le borohydrure de sodium qui les transforme en 17-20 glycols.

DEUXIÈME PARTIE

I. Les méthodes de Norymberski

Après avoir étudié l'action du bismuthate de sodium sur différents types de stéroïdes purs, NORYMBERSKI et ses collaborateurs ont mis au point plusieurs méthodes basées sur l'emploi de ce réactif, seul ou combiné à un réactif réducteur, pour le dosage des 17 α -hydroxy-corticostéroïdes.

DOSAGE DES STÉROIDES 17-CÉTOGÈNES

La seule action oxydante du bismuthate conduit au dosage des stéroïdes 17-cétogènes totaux, désignés dans la littérature anglo-saxonne par les termes de « 17-ketogenic steroids » ou « 17-oxogenic steroids », ou par les initiales 17-KGS, que nous utiliserons par la suite. Ce groupe comprend tous les stéroïdes hydroxylés en 17, sauf les 21-désoxy-17,20-cétols, auxquels s'ajoutent les 17-cétostéroïdes préexistants. Le dosage simultané des 17-CS permet d'évaluer par différence le taux des 17-KGS seuls, correspondant uniquement aux stéroïdes en C₂₁. NORYMBERSKI préconise pour ce dosage l'oxydation bismuthique en 30 minutes de l'urine (4 cm³) additionnée d'un égal volume d'acide acétique pur ; l'excès de bismuthate est réduit par 10 cm³ de solution à 6 % de métabisulfite de sodium ; le mélange est alors porté 10 minutes au bain-marie bouillant avec 6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré : après refroidissement on extrait par 10 cm³ de dichloro-éthane ; l'extrait est lavé une fois à la soude 3 N, et une fois à l'eau distillée ; la réaction de Zimmermann est alors pratiquée sur une partie aliquote de cet extrait évaporée à sec.

DOSAGE

DES 17-HYDROXY-CORTICOSTÉROIDES TOTAUX

La méthode d'Appleby et Norymberski (1) conduit au dosage des 17-hydroxy-stéroïdes totaux (1), groupe qui com-

(1) Nous les désignerons par la suite par les initiales 17-OH CS employées dans la littérature anglo-saxonne.

prend tous les stéroïdes hydroxylés en 17, et eux seuls. Une réduction préalable par le borohydrure de sodium (5 mg/cm³, laisser en contact une nuit), transforme les 17-CS préexistants en alcools secondaires qui ne seront pas réoxydés ultérieurement, et réduit les 17-20 cétoles 21-désoxygénés en 17-20 glycols susceptibles d'être scindés par l'oxydation. La suite du dosage est exactement analogue au dosage des 17-KGS.

DOSAGE DES 21-DÉSOXY-CÉTOLS

Les 21-désoxy,17,20-cétols peuvent être dosés spécifiquement par une méthode en trois temps (2) : une première oxydation bismuthique transforme en 17-CS tous les 17-hydroxy-corticostéroïdes, sauf les 21-désoxy-cétols ; une réduction au borohydrure élimine alors tous les 17-CS préexistants, et ceux qui se sont formés dans le premier temps, par transformation en 17-alcools, et réduit les stéroïdes à doser en α -glycols qu'une nouvelle oxydation bismuthique transforme alors en 17-CS que l'on dose par colorimétrie de la réaction de Zimmermann.

Les stéroïdes non oxygénés sur le carbone 21 existant dans l'urine en quantité normalement très faible, ils seront d'abord extraits par le chloroforme à partir de 800 cm³ d'urine hydrolysés par 80 cm³ d'acide chlorhydrique concentré à chaud en 10 minutes. Les extraits chloroformiques lavés sont réunis, séchés, évaporés. Le résidu est repris par 20 cm³ de mélange chloroforme-méthanol à parties égales. c'est sur la solution obtenue évaporée à sec qu'on pratique la réaction d'oxydation : l'extrait est réparti en deux parties égales dans deux tubes a et b ; le tube a est repris par 0,5 cm³ de butanol tertiaire aqueux à 80 % v/v, additionné de 4 cm³ d'acide acétique à 50 % et 0,5 g de bismuthate de sodium, agité pendant une heure : l'excès d'oxydant est réduit par 5 cm³ de solution à 6 % de métabisulfite de sodium ; le mélange est traité par 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, puis extrait par 25 cm³ de dichloro-éthane en agitant 15 minutes ; la phase organique séparée par centrifugation est lavée par la soude 3 N, puis par l'eau distillée, filtrée ; 20 cm³ de cet extrait sont alors évaporés à sec, repris par 0,5 cm³ de butanol tertiaire à 80 %, et abandonnés une nuit avec 20 mg de borohydrure de sodium ; la seconde oxydation est pratiquée selon le même processus que la première, l'extraction par 20 cm³ de dichloro-éthane et les lavages se font également par le même procédé déjà employé dans le premier temps : les 17-CS formés sont dosés sur une prise d'essai de 5 cm³ d'extrait. Le tube b subit le même traitement en com-

mençant au stade de la réduction par le borohydrure. Le tube a correspond aux 21-désoxy-cétols.

DÉTERMINATION DES STÉROÏDES A CHAÎNE DE DIHYDROXY-ACÉTONE

NORYMBERSKI et STUBBS (39) ont proposé une méthode d'évaluation des stéroïdes à chaîne latérale de di-hydroxy-acétone. Les stéroïdes à doser sont réduits par le zinc en poudre dans l'acide acétique : la réduction leur enlève le groupement hydroxyle en position 17, et le produit formé n'est pas oxydable par le bismuthate de sodium ; le dosage des 17-KGS totaux et des 17-KGS résistant au zinc permet d'évaluer par différence le taux des stéroïdes à chaîne latérale de dihydroxy-acétone.

DOSAGE DU PRÉGNANETRIOL

BONGIOVANNI le premier avait proposé une méthode de séparation chromatographique sur colonne du prégnanetriol, qu'il dosait ensuite par spectrophotométrie de sa réaction à l'acide sulfurique. HERMANN et SILVERMAN (30) ont appliqué à ce stéroïde séparé par chromatographie le dosage par oxydation bismuthique, et cette méthode a été reprise depuis (48) avec des résultats intéressants.

MODIFICATIONS PROPOSÉES A CES MÉTHODES

Plusieurs auteurs devaient par la suite utiliser les méthodes de Norymberski, et surtout les méthodes de dosage des 17-KGS et des 17-OH CS totaux, avec parfois certaines modifications portant sur les modalités de l'oxydation bismuthique et celles de l'extraction.

Modifications apportées aux conditions d'oxydation.

DICZFALLUZY et coll. (17) constatent, à la suite de PRUNTY (43) que dans les conditions décrites par NORYMBERSKI (1 g de bismuthate pour 4 cm³ d'urine, agitation de 30 minutes) l'oxydation peut être incomplète. Ils proposent en conséquence d'augmenter la proportion de bismuthate, et de porter la durée de l'oxydation aux environs de 18 heures. Ultérieurement, les auteurs (18) devaient s'accorder pour reconnaître que la qualité du bismuthate employé est un facteur primordial de l'oxydation dont dépendent en partie le temps de réaction et la concentration de réactif nécessaires pour

l'obtention de bons résultats. La plupart des auteurs ont retenu comme NORZYMBERSKI le milieu acétique à 50 % pour réaliser l'oxydation, bien que KELLIE préconise le milieu trichloracétique 0,4 M.

Variations dans la technique d'extraction.

Dans les milieux urinaires, NORZYMBERSKI fait régulièrement l'extraction des 17-CS formés par le dichloro-éthane ; divers auteurs ont préféré d'autres solvants : benzène selon JØRGENSEN (33), dichloro-méthane selon BORTH et coll. (9) et EDWARDS et KELLIE (20), ou éther selon RAFTOPOULO et coll. (44).

Suppression éventuelle de l'hydrolyse acide.

NORZYMBERSKI et SERMIN (38) ont montré que l'action du bismuthate de sodium suffit à transformer en formates ou en stéroïdes libres insolubles dans l'eau les dérivés glycurono-conjugués de l'urine. KELLIE (34) estime que les dérivés sulfo-conjugués ne représentent qu'une fraction très faible des formes d'élimination des stéroïdes, et que par conséquent l'hydrolyse chlorhydrique suivant l'oxydation bismuthique n'est pas rigoureusement indispensable.

Variations dans le mode d'estimation des 17-CS formés.

Tous les auteurs ont recours à l'une des variantes de la réaction de Zimmermann, mais NORZYMBERSKI utilise comme 17-CS étalon la déhydro-épi-androstérone, alors que d'autres auteurs utilisent l'androstérone. De toutes façons, les auteurs s'accordent généralement pour reconnaître que l'androstérone et la déhydro-épi-androstérone ont dans la réaction de Zimmermann des équivalents colorés très voisins, et cette différence de témoin ne semble pas devoir provoquer de grandes variations dans les résultats.

II. Techniques personnellement utilisées

Nous avons appliqué les méthodes de dosage des 17-OH CS et des 17-KGS à des urines sur lesquelles ont également été pratiqués les dosages des 17-CS et des chromogènes Porter et Silber.

DOSAGE DES 17-CS

Nous avons employé la technique décrite par HENRY et THÉVENET (28), basée sur la réaction de Zimmermann modifiée par CAHEN et SALTER. Les résultats sont exprimés en mg de déhydro-épi-androstérone.

Dans le but de nous rapprocher des méthodes d'extraction et de dosage qui terminent les méthodes de Norymberski, nous avons essayé pour les 17-CS, après hydrolyse de 4 cm³ d'urine au bain-marie bouillant 10 minutes avec 6 cm³ d'acide chlorhydrique pur, d'extraire par 10 cm³ de dichloro-éthane. L'extraît séparé par centrifugation est lavé par 5 cm³ de soude 3 N, puis par 5 cm³ d'eau distillée, et évaporé à sec. La réaction de Zimmermann est pratiquée sur le résidu. Les résultats obtenus ainsi sont presque toujours différents, et souvent plus forts que ceux fournis par la technique de HENRY et THÉVENET. La différence est probablement due à une purification insuffisante de l'extraît, et nous avons abandonné cette technique.

DOSAGE DES CHROMOGENES PORTER ET SILBER

Les 17,21-dihydroxy-20-cétostéroïdes ont été dosés par la méthode de Porter et Silber (42-58) modifiée décrite par SCHOLLER et coll. (55). Les lectures ont été faites au spectrophotomètre Graphispectral Jouan, les résultats exprimés en mg de cortisol.

DOSAGE DES 17-KGS

Les dosages des 17-OH CS et des 17-KGS suivent de très près les techniques proposées par NORYMBERSKI.

Pour les 17-KGS totaux, la technique est la suivante : recueillir les urines de 24 heures sur cyanure de mercure. Dans un tube à centrifuger, bouchant émeri, mesurer exactement 4 cm³ d'urine. Ajouter 4 cm³ d'acide acétique pur, et 1 g de bismuthate de sodium. Le tube est agité 5 heures sur un agitateur va-et-vient. Réduire l'excès de bismuthate par 10 cm³ de solution aqueuse à 6 % de métabisulfite de sodium. Ajouter alors 6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, et porter 10 minutes au bain-marie bouillant. Refroidir sous l'eau. Ajouter 10 cm³ exactement mesurés de dichloro-éthane, agiter mécaniquement pendant 15 minutes. Centrifuger. Eliminer la couche supérieure aqueuse par aspiration. Ajouter alors 5 cm³ d'eau distillée, agiter 5 minutes, centrifuger, éliminer l'eau comme précédemment. Ajouter alors 5 cm³ de soude 3 N, centrifuger et éliminer la soude par aspiration après avoir agité 3 minutes. Filtrer rapidement le dichloro-éthane. Evaporer à sec une partie aliquote (6 cm³ en général) dans un tube à essai, à température modérée. Les 17-CS formés sont dosés par la technique proposée par HENRY et THÉVENET (29) pour l'évaluation des fractions chromatographiées de 17-CS. Les résultats sont exprimés en mg de déhydro-épi-androstérone. Les 17-KGS seuls sont donnés par la différence :

$$17\text{-KGS seuls} = 17\text{-KGS totaux} - 17\text{-CS.}$$

DOSAGE DES 17-OH CS TOTAUX

Pour ce dosage, mesurer exactement dans un tube à centrifuger bouchant émeri 4 cm³ d'urine. Ajouter 20 mg de borohydrure de sodium. Laisser en contact une nuit. Ajouter alors l'acide acétique et le bismuthate, et continuer comme pour le dosage des 17-KGS.

III. Résultats obtenus dans les dosages urinaires

Nous avons appliqué ces méthodes au dosage des 17-OH CS et des 17-KGS dans des échantillons d'urines provenant de malades, hommes et femmes, presque tous adultes, pour la plupart hospitalisés dans un service d'endocrinologie.

Certains de ces malades étaient atteints d'affections sur-rénaliennes, d'autres avaient reçu des médications corticoïdes ou de l'A.C.T.H.

Sur ces urines ont été généralement pratiqués également les dosages des 17-CS et des chromogènes Porter et Silber.

ÉTUDE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Dosage des 17-OH CS.

Nous avons pratiqué le dosage des 17-OH CS sur 221 urines. La moyenne des 221 résultats obtenus est de 24,31 mg/24 heures, les taux les plus fréquents se situant entre 15 et 20 mg/24 heures (20,8 % des résultats). La moyenne des taux de chromogènes Porter et Silber trouvés sur les mêmes urines est de 13,25 mg/24 h., et le rapport :

$$\frac{\text{moyenne des taux de 17-OH CS}}{\text{moyenne des taux de Porter}} = 1,84.$$

Ultérieurement, 181 dosages ont été pratiqués dans le même laboratoire, sur une population de malades identique, par des opérateurs différents. Pour ce lot, la moyenne des résultats est de 25,03 mg/24 heures, les taux les plus fréquents étant entre 15 et 25 mg/24 heures (19,9 % des résultats sont entre 15 et 20 mg, et autant entre 20 et 25). La moyenne des taux de chromogènes Porter et Silber correspondants est de 10,98 mg/24 heures, et le rapport :

$$\frac{\text{moyenne des taux de 17-OH CS}}{\text{moyenne des taux de Porter}} = 2,28.$$

La moyenne des 402 dosages ainsi réunis est de 24,63 mg/24 heures. La courbe de répartition montre que le taux le plus fréquent est entre 15 et 20 mg/24 h. (19,90 %, des résultats), alors qu'il y a 16,16 % des résultats entre 10 et 15 mg, et 14,18 % des résultats entre 20 et 25 mg/24 heures. Pour l'ensemble des 402 dosages, la moyenne des taux de chromogènes Porter et Silber correspondants est de 12,23 mg/24 h., et le rapport :

$$\frac{\text{moyenne des taux de 17-OH CS}}{\text{moyenne des taux de Porter}} = 2,01.$$

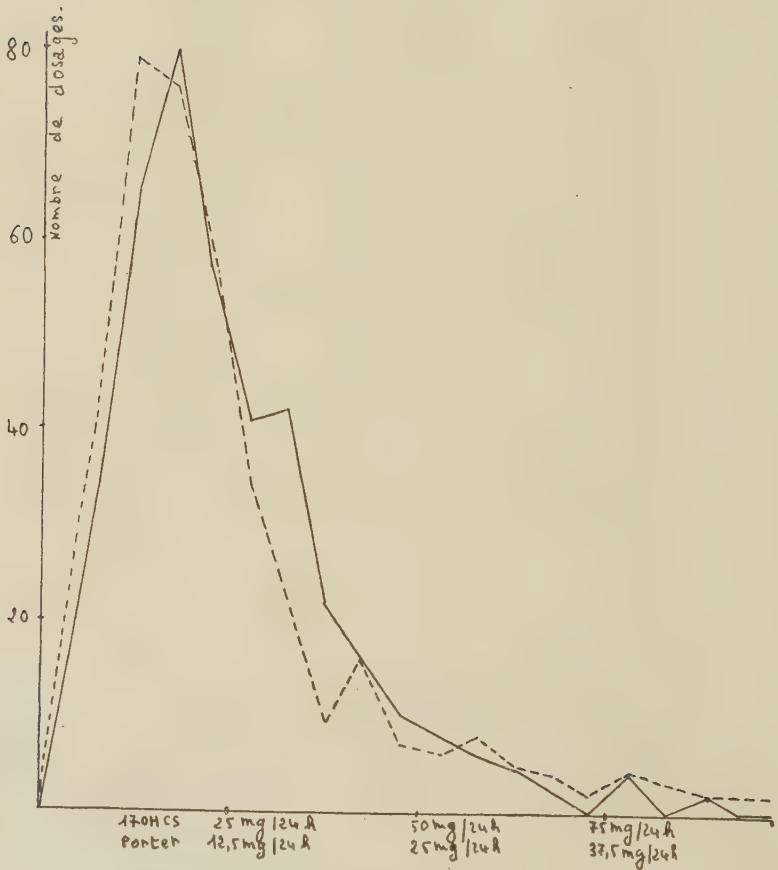


FIGURE 1
Répartition statistique comparée sur 402 dosages.

----- PORTER et SILBER
————— 17-OH CS

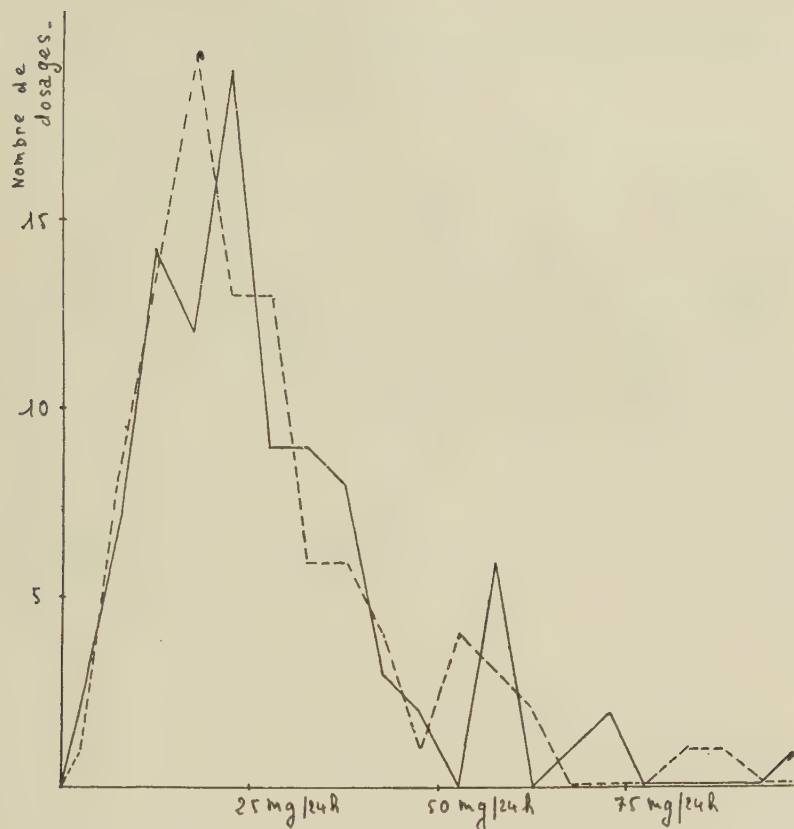


FIGURE 2

Répartition statistique comparée des 17-OH CS et 17-KGS

----- 17-OH CS
 ————— 17-KGS

L'écart standard s (variance), calculé sur les 402 résultats est de 16,47 ; en appliquant les lois de la distribution statistique normale, on prévoit que 95,5 % des résultats seront entre 0 et 57,57 mg/24 heures ($m - 2s$ et $m + 2s$), et 68 % des résultats entre 8,16 et 41,10 mg/24 heures ($m - s$ et $m + s$) ; en fait, 95,6 % des résultats sont compris entre $m - 2s$ et $m + 2s$, et 78,6 % des résultats entre $m - s$ et $m + s$. L'examen de la courbe de répartition fait ressortir que le taux le plus fréquent n'est pas la moyenne arithmétique des résultats. Les taux élevés, relativement fréquents, nous paraissent dûs souvent à des stimulations à l'A.C.T.H., ou à la présence parmi nos malades de plusieurs

syndromes hypersurrénaux. Pour cette raison, nous admettons comme valeurs limites normales du taux des 17-OH CS 10 et 25 mg/24 heures (48).

Nous n'avons pas noté de différence dans la répartition des taux trouvés chez les hommes d'une part, chez les femmes d'autre part. Dans l'ensemble, nos valeurs normales ne sont pas très différentes de celles qu'ont défini les autres auteurs. L'écart constamment rencontré entre les valeurs trouvées pour les 17-OH CS et les chromogènes Porter et Silber (sensiblement 2 fois plus de 17-OH CS) correspond aux faits bien connus que les stéroïdes surrénaliens sont éliminés en grande partie sous forme de dérivés hexa-hydrogénés, et que la réaction de Porter ne dose que les stéroïdes à chaîne de di-hydroxy-acétone.

Dosage des 17-KGS.

Nous avons fait le dosage des 17-KGS sur 100 urines pour lesquelles nous avons également dosé les 17-OH CS et

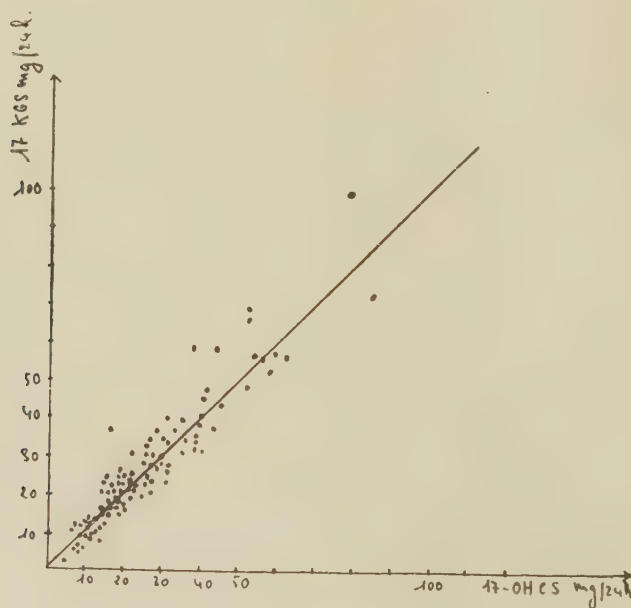


FIGURE 3

Taux des 17-KGS en fonction des taux de 17-OH CS.

les chromogènes Porter et Silber. Sur ces 100 dosages, le taux moyen des 17-KGS s'établit à 27,52 mg/24 heures, alors que le taux moyen des 17-OH CS correspondants est de 26,51 mg/24 heures. Les courbes de répartition statistique des résultats pour les 17-KGS et les 17-OH CS (courbes 2) sont extrêmement proches ; la courbe représentative du taux des 17-KGS en fonction de celui des 17-OH CS semble être une droite d'équation $y = x$ (fig. 3).

Nous en concluons que les taux de 17-KGS sont dans l'ensemble identiques aux taux de 17-OH CS, et que généralement leur détermination ne présente pas d'avantages. Comme par ailleurs, la détermination par différence des 17-KGS présente plus de risques d'erreur que la seule détermination des 17-OH CS, c'est ce dernier dosage que nous avons seul retenu pour les investigations cliniques de routine. Néanmoins, dans le cas d'une sécrétion massive de 17-hydroxy-progestérone, on doit trouver un taux de 17-KGS nettement inférieur à celui des 17-OH CS (APPLEBY et coll. 1).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Définition de la valeur normale.

Comme nous l'avons déjà signalé, l'interprétation de nos résultats de 17-OH CS nous amène à définir des valeurs limites normales non pas en fonction de la moyenne arithmétique des résultats — moyenne qui est influencée par un petit nombre de résultats très élevés obtenus après stimulation à l'A.C.T.H., ou chez des sujets présentant un syndrome hypersurrénalien, et même parfois après stimulation à l'A.C.T.H. chez des hypersurrénaux — mais en fonction des taux les plus fréquents, tels qu'ils apparaissent à l'examen des courbes de répartition statistique (courbe n° 1).

Ces courbes nous conduisent à admettre comme taux normaux, tant chez l'homme que chez la femme (fig. 4), les taux compris entre 10 et 25 mg/24 heures (moyenne = 17,5). Cette valeur normale paraît supérieure à celles qu'avaient publiées APPLEBY et NORYMBERSKI (1) en 1955, puis JORGENSEN (33) et SCHULLER (56-57) en 1956-57, mais elle concorde de façon satisfaisante avec les résultats publiés plus récemment par BORTH et coll. (9), SOBEL et coll. (59), GOLUB et coll. (22), et RAFTOPOULO et coll. (44) :

<i>Auteurs</i>	<i>Hommes</i>		<i>Femmes</i>	
	<i>Limites</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Limites</i>	<i>Moyenne</i>
APPLEBY et NORYMBERSKI, 1955.	6,2-17,2	13	5,7-17,4	11,14
JORGENSEN, 1957.	7-16	9-12	4-10	6-8
SCHULLER, 1956.		16,4		10,6
» 1957.			6,5-19	11
BORTH et coll., 1957.	6-21	11	4,5-16	9
SOBEL et coll., 1957.	8-25	16,5	5-18	11,5
GOLUB et coll., 1958.	9-25	17	6,18	12
RAFTOPOULO et coll., 1959.	8-20	15,2	8-20	13,2
Statistique personnelle, 1960.	10-25	17,5	10-25	17,5

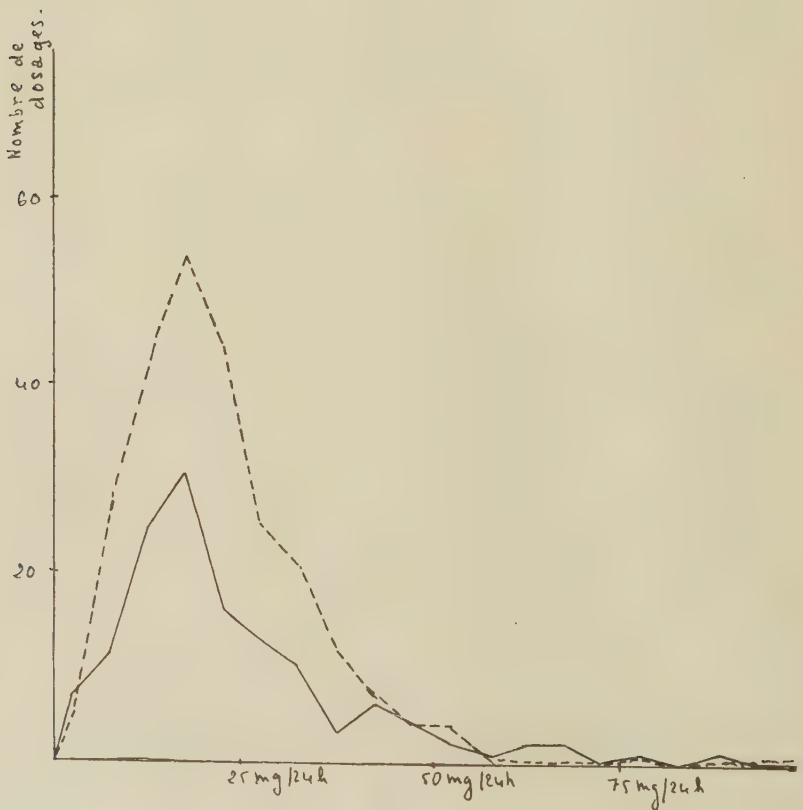


FIGURE 4
 Courbe de répartition des résultats
 chez les hommes —————
 et chez les femmes - - - - -

56,2 % de nos résultats se situent entre les limites normales de 10 et 25 mg par 24 heures.

Résultats des stimulations à l'A.C.T.H.

Parmi les résultats supérieurs à 25 mg/24 heures, un grand nombre est dû aux stimulations à l'A.C.T.H. (25 mg d'A.C.T.H. en perfusion de 8 heures). Ainsi, nous avons compté, sur 49 stimulations, 42 résultats après A.C.T.H. supérieurs à 25 mg/24 h. Les résultats d'ensemble de ces 49 stimulations sont exprimés dans le tableau suivant :

	<i>Avant A.C.T.H.</i>	<i>Après A.C.T.H.</i>	<i>Augmentation</i>
Chromogènes Porter et Silber en mg/24 h.	Moyenne = 11,21	Moyenne = 23,36	+ 108 %
17-OH-CS en mg/24 h.	Moyenne = 23,35	Moyenne = 40,97	+ 83 %
Rapport 17-OH CS/ Porter et Silber	1,99	1,75	

L'augmentation du taux des 17-OH CS sous l'effet de l'A.C.T.H. est de règle, mais cette augmentation paraît proportionnellement moins importante que celle du taux des chromogènes Porter et Silber.

Les chiffres pathologiques.

Nos résultats ont déjà fait l'objet d'une analyse en fonction des données de la clinique (48). Nous en retenons le fait que, en dehors des stimulations à l'A.C.T.H., les taux élevés sont retrouvés le plus souvent chez des malades atteints de syndrome de Cushing, ou d'hirsutisme d'origine surrénalienne, et concordent avec une augmentation du taux des stéroïdes dosés par la méthode de Porter et Silber. Nous avons cependant observé dans quelques cas une augmentation très importante du taux des 17-OH CS alors que les taux de cortisonurie étaient normaux, chez des malades qui éliminaient des quantités très élevées de prégnanetriol.

Pour illustrer ce cas, nous donnons ci-dessous les résultats trouvés chez une femme atteinte d'hyperplasie surrénale congénitale :

	<i>Avant A.C.T.H.</i>	<i>Après A.C.T.H.</i>
Chromogènes PORTER et SILBER	3 mg/24 heures	0,17 mg/24 heures
17-OH CS	64 mg/24 heures	175 mg/24 heures
Prégnanetriol	22,2 mg/24 heures	61,56 mg/24 heures

Les taux de 17-OH CS inférieurs à 10 mg/24 heures sont beaucoup plus rares que les taux élevés (12 % seulement des résultats). Ils concordent de façon constante avec des taux bas de chromogènes Porter et Silber, et peuvent le plus souvent être rapportés à une déficience anté-hypophysaire.

Nous pensons donc que le dosage des 17-OH CS complète, utilement l'emploi de la méthode de Porter et Silber. Le plus souvent, les deux méthodes concordent de façon très satisfaisante. Les discordances possibles entre un taux élevé de 17-OH CS et une cortisonurie normale feront suspecter une élimination forte des seuls stéroïdes hydroxylés en position 17 et 20.

D'autre part, la méthode de Norymberski nous paraît être une méthode précise d'investigation de l'élimination corticostéroïde, que sa simplicité technique rend particulièrement intéressante pour les dosages de routine.

TROISIÈME PARTIE

I. Le borohydrure et le bismuthate de sodium

La mise en œuvre des méthodes de Norymberski et d'Appleby-Norymberski est liée à l'emploi de deux réactifs, l'un réducteur et l'autre oxydant, qu'il importe de bien définir.

Nos premières observations sur ces réactifs ont été publiées dans une note préliminaire (4). Il peut paraître paradoxal de rassembler dans le même chapitre deux corps aussi différents ; en fait, le rapprochement n'est dû qu'à leur emploi successif dans la méthode étudiée.

LES BOROHYDRURES ALCALINS

Le réactif réducteur est le borohydrure de sodium ou de potassium, BH_4Na ou BH_4K . Le borohydrure de sodium se présente comme une poudre cristalline blanche hygroscopique. Les propriétés réductrices des borohydrures sont démontrées. En présence d'eau, le borohydrure se décompose rapidement avec dégagement d'hydrogène. Le borohydrure de sodium a été employé pour la première fois par ЧАЙКИН et coll. (12) pour la réduction ménagée des cétones, aldéhydes et chlorures d'acyles.

Action en série stéroïde.

L'application de ce réactif à l'analyse des stéroïdes est due à APPLEBY et coll. (1). Dans la série stéroïde, l'action du borohydrure s'exerce sur tous les substituants du noyau, tout en respectant le noyau lui-même. Notamment, une éventuelle double liaison en 4-5 n'est pas saturée par l'action de ce réactif ; par contre, toutes les fonctions cétones sont susceptibles d'être réduites en fonctions alcool secondaires correspondantes. Les fonctions cétones en 20 et 17 sont réduites au bout de quelques minutes. Une action plus prolongée conduit à la réduction des fonctions cétoniques en 3 et en 11. Les auteurs ont étudié en fonction du temps la réduction du di-hydroxy-3,17-dicéto-11,20-prégnane, et montrent que les corps à fonction cétonique en 20 disparaissent très rapidement du milieu réactionnel. Le taux des chromogènes en réaction de Zimmermann trouvés après oxydation bismuthique

s'accroît rapidement pendant les dix premières minutes de la réaction, puis décroît légèrement pendant 7 heures. Finalement, une réaction brève aboutit à la formation de trihydroxy-3,17,20-one-11-prégnane, tandis qu'une réaction plus prolongée aboutit au tétra-hydroxy-3,11,17,20-prégnane. Par conséquent, la réduction de la fonction cétone est beaucoup plus lente en position 11 qu'en position 20. Le groupement Δ_4 -3-cétone fréquemment rencontré est réduit en Δ_4 -3 β -ol. La réduction ne touche jamais les fonctions alcools préexistantes, ni celles qui résultent de la réduction des cétones.

La réduction par le borohydrure prépare le substrat urinaire pour l'oxydation par le bismuthate de sodium.

LE BISMUTHATE DE SODIUM

Propriétés générales du bismuthate.

Le bismuthate de sodium, BiO_3Na , se présente sous forme de poudre brun-chamois d'aspect d'ailleurs variable selon les échantillons.

Les traités de chimie minérale ne donnent que peu de précisions sur ces dérivés du bismuth pentavalent, qu'ils considèrent d'ailleurs comme mal définis.

Néanmoins, SCHOLDER et STOBBE (54) et RIGBY (49-50) ont étudié les bismuthates, et montré leur intérêt en temps que réactifs oxydants.

Les bismuthates sont obtenus à partir du bismuth trivalent oxydé dans un milieu très alcalin (NaOH ou KOH concentrée) par un hypochlorite, le chlore, le brome ou un persulfate. Les conditions réactionnelles de température et de concentration des différents réactifs influent profondément sur la qualité du produit obtenu. SCHOLDER et STOBBE mentionnent la possibilité de formation de différentes combinaisons moléculaires du bismuthate avec l'eau et la soude. Quoiqu'il en soit, le bismuth pentavalent du bismuthate de sodium se comporte comme un oxydant puissant, susceptible de céder de l'oxygène en prenant la valence 3. Cette action oxydante se manifeste vis-à-vis des iodures dont l'iode est déplacé, des sels ferreux oxydés en sels ferriques, des sels manganoux oxydés en permanganate, du glucose qui est susceptible de consommer le bismuthate, des α -hydroxy-acides oxydés en aldéhydes ou cétones. Cette action se manifeste en milieu acide, soit acétique à 50 % (10), soit trichloroacétique 0,4 M (20), aqueux ou organique. Parmi les milieux organiques, NORYMBERSKI a retenu pour réaliser l'oxydation des stéroïdes l'alcool éthylique et le butanol tertiaire. Le bis-

muthate de sodium est insoluble dans ces deux solvants et dans l'eau ; l'excès de réactif pourra donc dans tous les cas être aisément éliminé du milieu réactionnel par centrifugation. En outre, le bismuthate de sodium ne réagit ni sur le butanol tertiaire, ni sur l'alcool éthylique.

Titration du bismuthate.

Le bismuthate commercial étant un produit mal défini, il importe d'en titrer le pouvoir oxydant. Pour ce titrage, différentes méthodes ont été proposées : par iodométrie, par oxydation d'un sel ferreux, par rupture oxydative de l'éthylène-glycol et dosage pondéral du formol libéré à l'état de complexe avec le dimédon (50), par oxydation d'un sel de manganèse et dosage par le sel de Mohr du permanganate formé (18).

Action en série stéroïde.

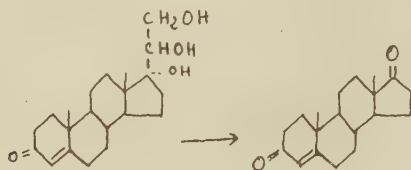
Dans la série stéroïde, l'action oxydante du bismuthate de sodium porte sur la chaîne latérale tri-oxygénée portée par le carbone 17. Les glycols en 17-20 sont scindés avec formation de 17-cétostéroïdes. Les 17-20 cétols sont également scindés, sauf les 21-désoxy-17,20-cétols. Dans tous les cas, l'oxydation respecte le noyau, et même en présence d'un grand excès de réactif, BROOKS et NORIMBERSKI n'observèrent jamais d'effet sur les substituants du noyau.

Les actions du bismuthate et du borohydrure sur les différentes chaînes latérales des stéroïdes sont représentées dans le tableau II, ainsi que les résultats obtenus en combinant ces actions.

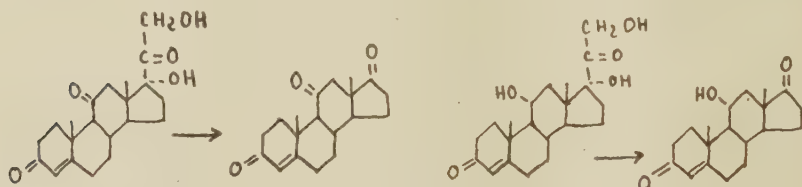
TABLEAU II

chaîne de départ	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$
$\text{BiO}_3\text{Na} \rightarrow$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$
$\text{BH}_4\text{Na} \rightarrow$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{C} \cdots \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$
$\left. \begin{array}{l} \text{BH}_4\text{Na} \\ \text{BiO}_3\text{Na} \end{array} \right\} \rightarrow$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$
$\left. \begin{array}{l} \text{BiO}_3\text{Na} \\ \text{BH}_4\text{Na} \\ \text{BiO}_3\text{Na} \end{array} \right\} \rightarrow$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \end{array}$

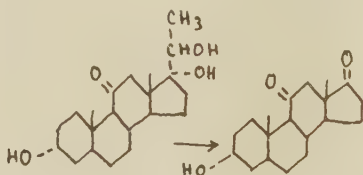
BROOKS et NORIMBERSKI (10) ont montré que le tri-hydroxy-17 α -20,21-one-3-prégnène-4 est oxydé en androstène-dione ;



la cortisone est oxydée en adrénostérone, le cortisol en hydroxy-11 β -androstène-dione ;



le tri-hydroxy-3 α ,17 α ,20-one-11-prégnane est oxydé en hydroxy-3 α -dicéto-androstène.



Ils montrent également que le dihydroxy-3 α ,17 α -dicéto-11,20-prégnane n'est pas modifié par l'action du bismuthate, et que le tri-hydroxy-3 β ,20 β ,21-prégnène-5 et la DOC sont oxydés respectivement en 17 β -formyl-ol-3 β -androstène-5 (non isolé) et en acide 3-oxoeti-4-énique.

Notons que l'action oxydante du bismuthate trouve des applications dans la préparation des stéroïdes. Ainsi, nous avons pu disposer, grâce à l'obligeance de Monsieur PESEZ, Directeur technique de la société U.C.L.A.F., d'hydroxy-11 β -androstène-dione préparée à partir du cortisol par oxydation bismuthique.

II. Etude de l'action du borohydrure

Les travaux antérieurs indiquent que le borohydrure de sodium, en série stéroïde, réduit les fonctions cétoniques, et présente de ce fait deux avantages : il élimine du milieu réactionnel les 17-CS, et il réduit les fonctions cétoniques en position 20, rendant ainsi accessibles à l'oxydation bismuthique les 17-20 cétoles non oxygénés sur le carbone 21.

ACTION SUR LA FONCTION CÉTONE 17

Action qualitative.

Nous avons à plusieurs reprises vérifié sur différents échantillons d'urines, et pour différents lots de borohydrure de sodium, l'activité du produit sur les 17-CS. Une prise d'essai de 4 cm³ d'urine est traitée par 20 mg de borohydrure de sodium pendant une nuit. Le mélange est alors additionné de 4 cm³ d'acide acétique pur, 10 cm³ d'eau distillée, et 6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, pour se placer dans des conditions de dilution et de milieu semblables à celles des dosages. L'extraction se fait en agitant 15 minutes avec 10 cm³ de dichloro-éthane. L'extrait est lavé à l'eau distillée, puis à la soude 3 N. Une partie aliquote de cet extrait est évaporée à température modérée. On n'y retrouve jamais de 17-CS (la réaction de Zimmermann est toujours négative).

Le même essai a été pratiqué sur 100 et 200 microgrammes de déhydro-épi-androstérone en solution alcoolique évaporée dans le tube à centrifuger et repris par 4 cm³ d'eau distillée, puis traités comme les urines dans l'expérience précédente. Là encore, la réaction de Zimmermann est toujours négative : le 17-CS a été détruit par la réduction

Cinétique de la réaction.

L'étude de la cinétique de la réaction a été réalisée sur une solution aqueuse fraîchement préparée de déhydro-épi-androstérone, saturée à la température ambiante. 6 prises d'essai de 5 cm³ chacune ont été mesurées dans des ampoules

à décantation. La première prise d'essai est extraite immédiatement par 10 cm³ de dichloro-éthane. Les autres échantillons sont additionnés chacun de 20 mg de borohydrure de sodium. L'extraction par 10 cm³ de dichloro-éthane est faite

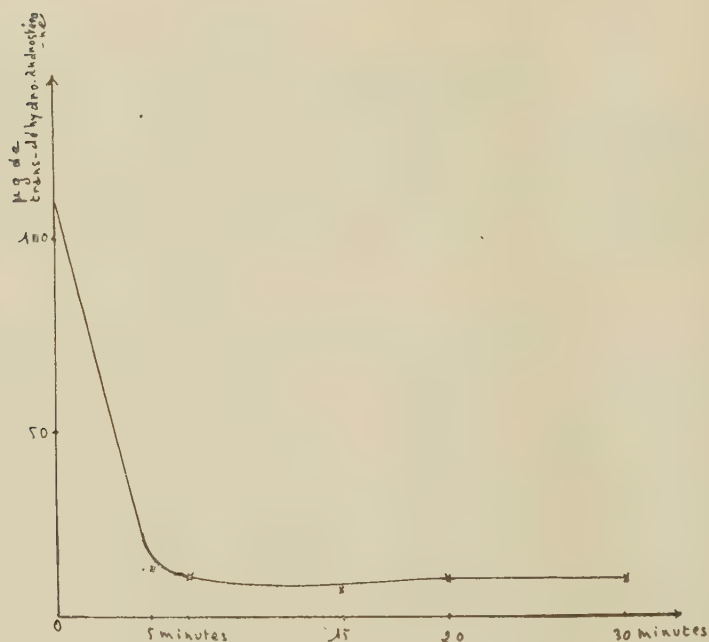


FIGURE 5
*Cinétique de la réduction de la fonction cétone en 17
par BH_4Na .*

respectivement au bout de 5, 7, 15, 20 et 30 minutes de réduction. De chaque extrait, une partie aliquote évaporée à température modérée sert au dosage des 17-CS par la réaction de Zimmermann, selon la modalité décrite par HENRY et THIÉVENET en 1954 (29), la réaction étant lue à l'électro-photomètre de MEUNIER. Les résultats obtenus se traduisent par la courbe de la figure 5 ; il reste 11,9 % du 17-CS après 5 minutes de réaction, 10 % après 7 minutes, et 9 % au bout de 30 minutes de réduction.

ACTION SUR LA FONCTION CÉTONE 20

Nous l'avons étudié sur une solution aqueuse saturée à la température ambiante de cortisone pure ⁽¹⁾. Six prises d'essai de 5 cm³ chacune sont mesurées dans six ampoules à décantation. L'une d'elles est extraite immédiatement par 20 cm³ de chloroforme. Les autres sont additionnées de 20 mg de borohydrure chacune, et extraite par 20 cm³ de chloro-

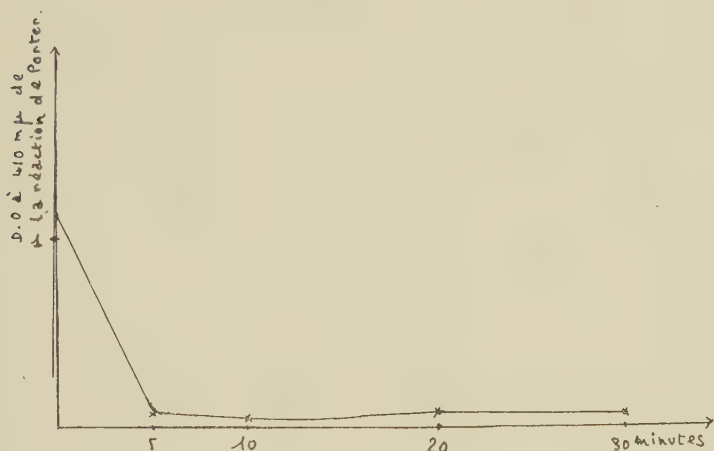


FIGURE 6
Cinétique de la réduction de la fonction cétonique en 20 par BH_4Na .

forme respectivement au bout de 5, 10, 15, 20 et 30 minutes de réduction. Chaque extrait chloroformique est divisé en trois fractions de 5 cm³ chacune. Les corps à fonction cétonique en 20 sont évalués dans l'extrait par la réaction de Porter pratiquée selon la technique décrite par SCHOLLER, BUSIGNY et JAYLE (55) : une des fractions de 5 cm³ d'extrait chloroformique est traitée par 3 cm³ de réactif à la phényl-hydrazine sulfurique, une fraction identique est traitée par 3 cm³ de réactif sulfurique sans phényl-hydrazine qui sert de blanc. Les réactifs décantés sont recueillis et portés au bain-marie. Les densités optiques sont mesurées au spectro-photomètre à

(1) La cortisone pure, ainsi que les 17-CS purs employés plus loin comme témoins dans les chromatographies, nous a été aimablement donnée par Monsieur PESEZ, Directeur technique de la Société UCLAF, à qui nous exprimons ici nos remerciements.

410 m μ . Les résultats obtenus se traduisent par la courbe de la figure 6. Les densités optiques (en pourcentage de la valeur trouvée pour la cortisone non réduite par le borohydrure) sont les suivantes :

après	5 minutes	de réduction	1,4 %
»	10	»	1,85 %
»	15	»	2,3 %
»	20	»	5,5 %
»	30	»	2,8 %

ACTION SUR LA FONCTION CÉTONE 3

La cinétique de la réduction de cette fonction a été déterminée sur la fraction de 5 cm³ d'extract chloroformique restant après l'expérience précédente, évaporée à sec et reprise par le méthanol. Le résidu correspondant à la cortisone non réduite est repris par 12 cm³ de méthanol, les autres par

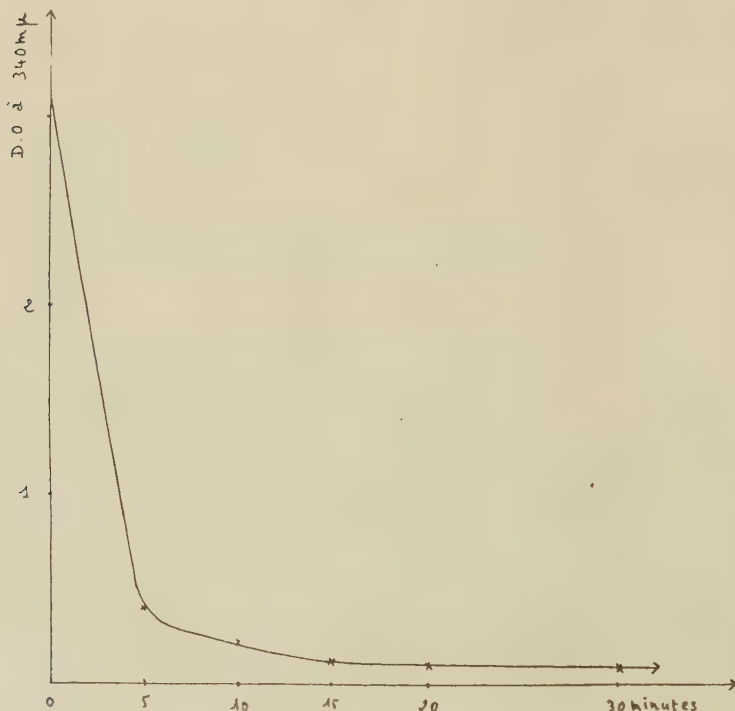


FIGURE 7 .

*Cinétique de la réduction de la fonction cétone en 3
par BH_4Na .*

3 cm³ seulement de ce solvant. La densité optique est lue au spectro-photomètre à 240 m μ . Compte tenu de la dilution plus grande du tube témoin avant réduction, les densités optiques sont respectivement de 13 %, 7 %, 3,7 %, 3,4 % et 3,4 % de la densité optique du tube témoin non réduit. Ces résultats sont représentés par la courbe de la figure 7.

ACTION SUR LES STÉROIDES URINAIRES

La réduction des fonctions cétoniques des stéroïdes en milieu pur s'avère extrêmement rapide. Il nous a paru intéressant de voir dans quelle mesure la cinétique de la réaction est modifiée lorsque l'on passe d'un milieu aqueux pur à un milieu urinaire.

Pour ce faire, nous sommes partis d'une urine quelconque normale. 20 cm³ de cette urine, additionnés d'un égal volume d'acide acétique pur, sont agités 30 minutes avec 5 g de bismuthate de sodium. Nous pensons qu'ainsi tous les

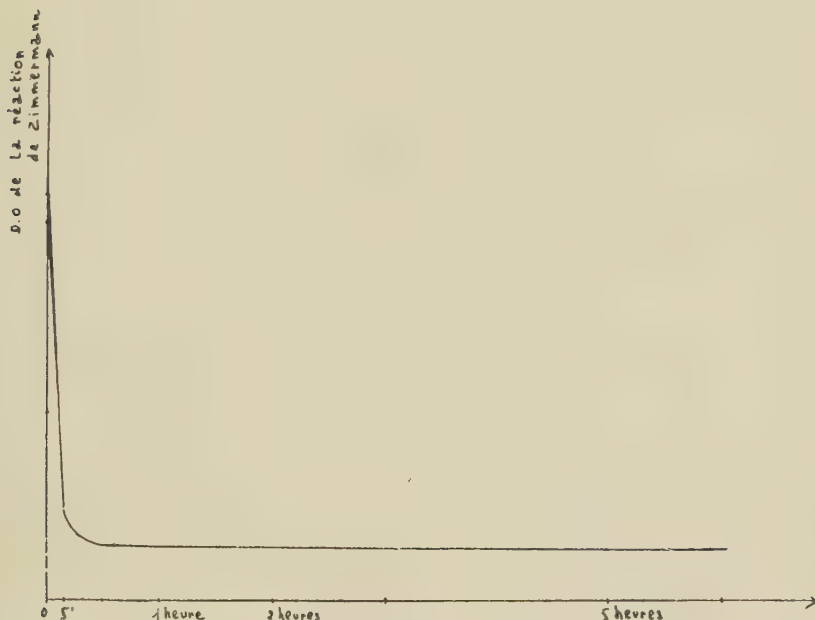


FIGURE 8
*Cinétique de la réduction par BH_4Na
en milieu urinaire.*

stéroïdes 17-hydroxylés de l'urine sont transformés en 17-CS, et que les fonctions hydroxylées en 3 et en 11 de tous les stéroïdes sont transformées en fonctions cétoniques correspondantes. Le mélange est centrifugé pour en éliminer le bismuthate et neutralisé par la soude. Sept prises d'essai de 4 cm³ de surnageant clair neutralisé sont réparties dans 7 ampoules à décantation. L'une d'elles est immédiatement extraite par 10 cm³ de dichloro-éthane. Les autres sont additionnées de 20 mg de borohydrure de sodium, et extraites par 10 cm³ de dichloro-éthane respectivement au bout de 10, 20, 30 minutes, 1 heure, 5 heures et 6 heures. Les extraits obtenus sont lavés à la soude 3 N, puis à l'eau distillée, puis 5 cm³ de chaque extrait sont évaporés à sec. Sur le résidu d'évaporation est pratiquée la réaction de Zimmermann.

Les résultats sont donnés par la courbe de la figure 8. On voit que, là encore, la réaction est extrêmement rapide.

III. Etude de l'action du bismuthate

DÉFINITION DU RÉACTIF, DOSAGES

Le bismuthate de sodium que nous avons utilisé était du bismuthate « Prolabo » et du bismuthate « Serlabo ». Les différents lots que nous avons eus étaient d'aspect voisin, sauf un dont la couleur était beaucoup plus pâle qu'elle ne l'est habituellement.

Qualitativement, tous ces échantillons déplacent l'iode des iodures. Sur ces produits, nous avons réalisé le titrage du pouvoir oxydant selon une des méthodes proposées par Rigby : une prise d'essai de bismuthate de sodium exactement pesée de 0,20 g est placée dans un erlenmeyer, additionnée de 20 cm³ de solution N/10 de sulfate ferreux (nous avons employé le sel de Mohr) dans l'acide sulfurique environ 4 N, de 5 cm³ d'acide phosphorique, et de quelques billes de verre. Après agitation, l'excès de sel ferreux est titré par une solution de bichromate de potassium N/10, la fin de réaction étant indiquée par l'emploi d'une solution de ferrocyanure de potassium comme indicateur externe.

D'après la formule théorique BiO_3Na , et en admettant que le bismuth passe au cours de la réaction de la valence 5 à la valence 3, un gramme de bismuthate devrait correspondre à 0,007 valence-gramme d'oxygène, c'est-à-dire qu'il devrait consommer 70 cm³ de solution ferreuse décinormale.

Les résultats des dosages effectués sur différents échantillons de bismuthate « Prolabo » et « Serlabo » sont les suivants :

				<i>cm³ de Fe++ N/10 consommés par 1 g</i>
1 ^{er}	dosage,	bismuthate	Prolabo	49,5
2 ^{me}	»	»	Serlabo	52,5
3 ^{me}	»	»	Prolabo	53,7
4 ^{me}	»	»	Serlabo	46,2
5 ^{me}	»	»	Serlabo	50

Nous en concluons que les différents échantillons de réactif que nous avons utilisés sont suffisamment proches par leurs capacités oxydantes pour ce comporter de façon identique dans les dosages.

ÉTUDE QUALITATIVE DE L'OXYDATION DES STÉROÏDES PURS

Conditions de la réaction.

Nous avons étudié l'action du bismuthate de sodium sur des solutions pures de cortisone et de cortisol dans les mêmes conditions que celles des dosages urinaires : 5 cm³ de solution à 200 microgrammes/cm³ de chaque stéroïde, soit 1 mg, ont été évaporés à sec, puis chaque résidu repris par 20 cm³ de butanol tertiaire aqueux à 80 % v/v, et traité comme le sont les urines au cours du dosage des 17-KGS, les doses de tous les réactifs étant simplement multipliées par 5 pour respecter les proportions des divers éléments de la réaction. L'extrait final, évaporé à sec est repris par 0,8 cm³ d'éthanol absolu. Ce mode opératoire permet de réaliser des conditions de concentration et de durée d'action des différents réactifs identiques à celles des dosages urinaires. La reprise du résidu par 0,8 cm³ de solvant vise à obtenir — compte tenu des pertes de stéroïde inévitables au cours des manipulations, et notamment des lavages et de la filtration de l'extrait au dichloro-éthane — une solution finale contenant environ 1 mg de stéroïde par cm³, concentration qui est commode pour l'analyse chromatographique de cette solution.

Techniques employées pour la séparation et l'identification des produits d'oxydation.

A partir des solutions ainsi préparées, nous avons fait des chromatographies sur papier pour identifier les produits formés. Nous avons eu recours à plusieurs des systèmes de solvants préconisés par SAVARD (53), et ZAFFARONI (67-69-70) et utilisés par la suite par BAULIEU et coll. (7) :

Toluène saturé de propane-diol-1,2 (phase mobile)-propane-diol-1,2 (utilisé comme phase stationnaire sous forme de solution à 50 % dans le méthanol dont on imbibe le papier, qu'on sèche immédiatement entre deux feuilles de papier-filtre, et sur lequel les solutions à chromatographier sont

déposées le plus rapidement possible, et qui est placé sans retard dans l'atmosphère saturée de solvants de la cuve à chromatographies) selon ZAFFARONI (69) ;

Ether de pétrole saturé de propane-diol (phase mobile)-propane-diol (utilisé dans les mêmes conditions que dans le système précédent comme phase stationnaire) selon SAVARD (53) :

Mélange à volumes égaux d'hexane et de benzène saturé de propane-diol (phase mobile)-propane-diol (utilisé dans les mêmes conditions comme phase stationnaire) ;

Chloroforme saturé de formamide (phase mobile)-formamide (utilisée comme phase stationnaire dans les mêmes conditions que le propane-diol des systèmes précédents) selon SAVARD (53).

Nous avons employé exclusivement du papier Whatmann n° 1. Les migrations ont toutes été réalisées en chromatographie descendante, à la température ambiante d'environ 20°, soit à front visible, soit, plus souvent, avec écoulement de plusieurs heures pour obtenir une meilleure séparation des différents spots. Nous avons toujours déposé des volumes de solution correspondant à 10 μ g de stéroïde.

Sur quelques chromatogrammes, nous avons déposé comme témoin de la cortisone et du cortisol, et les bandes ont été révélées au bleu de tétrazolium. La plupart des chromatogrammes ont migré avec, comme témoins, de l'androstènedione et de l'adrénostérone, ou de l'hydroxy-11 β -androstènedione et de l'adrénostérone. Dans ces cas, nous avons utilisé divers types de révélation : examen en lumière ultra-violettes à 240 m μ , réaction de Zimmermann, réactions à l'acide phosphorique, à l'acide para-toluène sulfonique, à l'isonicotylhydrazide.

L'expérience a été répétée intégralement (oxydation de cortisone et de cortisol, extraction et lavages, chromatographie du produit obtenu) afin d'éliminer d'éventuels artefacts.

Caractérisation des produits obtenus par oxydation de la cortisone et du cortisol.

Nous donnons (figure 9) la reproduction schématique d'un de nos chromatogrammes migré dans le système hexane-benzène-propane-diol, afin de situer les positions des spots dont nous indiquons plus loin la réactivité.

Le tableau suivant donne les mobilités des différents stéroïdes dans le système hexane-benzène-propane-diol. Les mobilités sont exprimées par le R_r tel qu'il est défini par SAVARD (53), calculé en se référant à l'étalon d'adrénostérone

dont nous avons trouvé, dans ce système, le coefficient de mobilité K égal à 4,69 cm/heure :

<i>Stéroïde</i>	<i>R_t</i>
Témoin de hydroxy-11 β -androstène-dione!.....	 1,38
Produit d'oxydation de la cortisone.....	 4,65
Produits d'oxydation du cortisol).....	 1,46
.....	 4,65

En T ont été déposées les solutions de hydroxy-11 β -androstène-dione et d'adrénostérone.

En E a été déposé le produit d'oxydation de la cortisone.

En F a été déposé le produit d'oxydation du cortisol.

— toutes les taches apparaissent en UV à 240 m μ .

— toutes les taches donnent la réaction de Zimmermann.

— toutes les taches se colorent en jaune par l'I.N.H.

— les taches numérotées 1 et 4 donnent les réactions aux acides phosphorique et p-toluène-sulfonique.

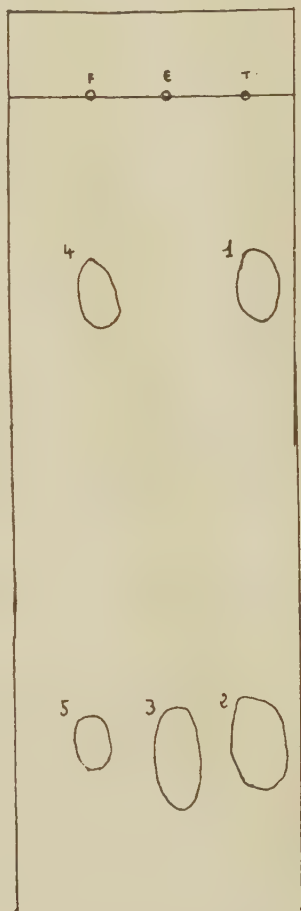


FIGURE 9

Réactivité du produit d'oxydation de la cortisone.

— Il ne subsiste aucun stéroïde donnant une réaction décelable au bleu de tétrazolium.

— Il se forme un seul corps qui :

- dans tous les systèmes que nous avons employés a une mobilité très proche de celle de l'adrénostérone,
- est révélé en lumière ultra-violette à 240 m μ (donc possède le groupement Δ_4 -3-cétone),
- est révélé en jaune par l'isonicotyl-hydrazide,
- est révélé par la réaction de Zimmermann (donc 17-cétonique).

Réactivité des produits d'oxydation du cortisol.

— Il ne subsiste aucun corps donnant une réaction décelable au bleu de tétrazolium.

— Il se forme deux corps bien séparés sur les chromatogrammes, qui sont tous deux révélés en lumière ultra-violette à 240 m μ , révélés par la réaction de Zimmermann, et par la réaction à l'isonicotyl-hydrazide :

- l'un a dans tous les systèmes que nous avons employés une migration très voisine de celle de l'adrénostérone,
- l'autre a dans tous les systèmes que nous avons employés une migration très voisine de celle de l'hydroxy-11 β -androstène-dione, est révélé en rose dans le visible, en jaune dans l'ultra-violet banal par l'acide phosphorique (comme le témoin d'hydroxy-11 β -androstène-dione), est révélé en rose par l'acide para-toluène sulfonique (comme le témoin d'hydroxy-11 β -androstène-dione).

Essai d'évaluation quantitative.

Rappelons que nous avons toujours posé des volumes de solution-témoin contenant 10 microgrammes de stéroïde, et des volumes de solution en expérience qui devaient en renfermer sensiblement autant si la réaction d'oxydation est quantitative. L'intensité et la surface de la tache obtenue pour le produit d'oxydation de la cortisone, comparée aux caractéristiques des spots témoins de 17-CS correspond à la quantité prévue de stéroïde : dans les limites de sensibilité de

la méthode, la réaction paraît quantitative. Pour les produits d'oxydation du cortisol, le coefficient de récupération paraît également satisfaisant ; on remarque surtout qu'il se forme environ 3 à 4 fois plus du produit le plus polaire que de l'autre.

De ces expériences, nous concluons que, dans les conditions où nous opérons, la cortisone est oxydée à peu près quantitativement en adrénostérone ; le cortisol est oxydé en majeure partie en hydroxy-11 β -androstène-dione, mais il se forme aussi un peu d'adrénostérone.

ÉTUDE QUANTITATIVE DE L'OXYDATION DES STÉROIDES PURS

Nous avons d'abord pensé qu'en traitant la cortisone ou le cortisol exactement dans les mêmes conditions que les urines, nous devons retrouver la presque totalité des stéroïdes sous forme de 17-CS. Nous avons donc opéré comme suit : une prise d'essai connue de solution alcoolique titrée de cortisone ou de cortisol (renfermant en général 100 ou 200 microgrammes de stéroïde pur) est évaporée à sec au fond d'un tube à centrifuger. On ajoute alors dans le tube 4 cm³ d'eau distillée, 4 cm³ d'acide acétique, et 1 g de bismuthate de sodium. Le mélange est agité 5 heures, puis on continue exactement comme un dosage urinaire de 17-KGS. L'oxydation bismuthique peut éventuellement être précédée de la réduction au borohydrure.

L'expérience, souvent répétée, ne nous a jamais permis de retrouver toute la quantité de stéroïde attendue. Dans les meilleures conditions, on ne retrouve que 50 à 55 % de la cortisone, et 40 à 45 % du cortisol. Une telle différence ne peut être expliquée ni par la différence d'équivalents colorés en réaction de Zimmermann des stéroïdes formés (hydroxy-11 β -androstène-dione et adrénostérone) par rapport à notre étalon (déhydro-épi-androstérone), ni par la différence entre les masses moléculaires de la cortisone et du cortisol d'une part, et des 17-cétostéroïdes d'autre part (les résultats étant exprimés en fait en mg de déhydro-épi-androstérone, et non en mg de cortisol ou de cortisone).

*Influence du traitement par l'acide chlorhydrique chaud.
Valeur de l'extraction.*

Nous avons alors pensé que la différence pourrait être attribuée soit à une destruction partielle des stéroïdes au

cours de l'hydrolyse chlorhydrique à chaud, soit à une extraction incomplète des 17-CS formés par le dichloro-éthane. Nous avons donc évaporé à sec dans 4 tubes 1 cm³ de solution à 200 µg/cm³ de cortisol dans l'éthanol absolu. Chaque tube a été repris par 4 cm³ d'eau distillée, puis traité comme un dosage de 17-KGS. Cependant, après la réduction par le métabisulfite de sodium de l'excès de bismuthate, deux des tubes ont été normalement traités par l'acide chlorhydrique concentré au bain-marie bouillant, les deux autres ont été traités par 6 cm³ d'acide chlorhydrique concentré pour dissoudre le précipité, mais n'ont pas été chauffés et ont été extraits immédiatement par 10 cm³ de dichloro-éthane. Une seconde extraction a été ensuite pratiquée par le même solvant, dans les mêmes conditions, sur la phase aqueuse décantée.

La quantité de stéroïde retrouvée est identique qu'il y ait eu ou non hydrolyse chlorhydrique à chaud. Le deuxième extrait ne contient qu'une quantité négligeable de 17-CS, et on ne retrouve finalement que 42,5 et 49 % des quantités de stéroïdes attendues. Force est donc de conclure que l'hydrolyse chlorhydrique n'est pas en cause, et que l'extraction au dichloro-éthane est suffisante.

L'oxydation est-elle complète ?

Nous nous sommes alors demandé si, dans les conditions où nous opérons, l'oxydation bismuthique est bien complète. Deux prises d'essai de 1 cm³ de solution à 200 µg/cm³ de cortisone, et deux prises d'essai de 1 cm³ de solution à 200 µg/cm³ de cortisol évaporées à sec, puis reprises par 4 cm³ d'eau distillée ont été traitées selon la technique décrite pour le dosage des 17-KGS. L'extrait final a été divisé en deux parties. Sur l'une des fractions, on a pratiqué la réaction de Zimmermann, et retrouvé sous forme de 17-CS 64 % de la cortisone, et 38 % du cortisol. L'autre fraction, évaporée à sec, est traitée par 3 cm³ de réactif de Porter à la phénylhydrazine sulfurique, et simultanément des témoins de cortisone sont traités de la même façon. La réaction se développe avec la cortisone, tandis que pour l'extrait il n'apparaît pas de coloration. Pour la cortisone, le spectre présente un maximum à 410 mµ alors que pour l'extrait la densité optique décroît régulièrement de 360 à 460 mµ, et il n'y a pas de maximum d'absorption dans cette zone. Il faut donc admettre qu'il ne reste pas de cortisone non oxydée après la réaction.

Influence du solvant.

Restait une dernière explication à envisager : la reprise par l'eau des stéroïdes déposés au fond du tube sous forme de solution alcoolique évaporée n'est peut-être pas totale. Nous avons donc fait des dosages, toujours selon la même technique, sur de la cortisone pure en solution alcoolique (4 cm³ de solution contenant 200 microgrammes de cortisone) et sur 200 microgrammes de cortisone repris par 4 cm³ de butanol tertiaire aqueux à 80 % v/v.

Dans ces conditions, nous retrouvons 81 % de la cortisone lorsque l'oxydation a été faite dans l'éthanol, et 91 à 97 % de la cortisone lorsque l'oxydation a été faite dans le butanol tertiaire aqueux. Ce résultat nous amène à deux constatations :

— le butanol tertiaire est le solvant de choix pour réaliser l'oxydation des stéroïdes en milieu pur,

— l'oxydation n'est totale que si les stéroïdes sont convenablement dissous dans un solvant approprié ; la réaction est alors pratiquement quantitative.

ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'ACTION DU BISMUTHATE SUR LES STÉROIDES PURS

Il reste cependant un facteur essentiel de la réaction, dont divers auteurs avaient déjà signalé l'importance (43-17), et dont il nous a paru intéressant d'étudier l'influence : c'est la durée de l'oxydation.

Processus expérimental.

Nous avons réalisé cette étude sur des solutions aqueuses saturées à la température ordinaire de cortisone et de cortisol. Ces solutions ont été traitées comme le sont les urines dans le dosage des 17-KGS, mais avec des durées d'oxydation variables de 10 minutes à 8 heures. La réaction est suivie par le dosage dans une partie aliquote de l'extrait final des 17-CS formés par la réaction de Zimmermann, et pour la cortisone, par le dosage sur une autre partie aliquote d'extrait de la cortisone non encore oxydée par la réaction de Porter et Silber.

Résultats obtenus.

Ceci nous a permis d'établir les courbes d'oxydation cinétique de la cortisone et du cortisol des figures 10 et 11.

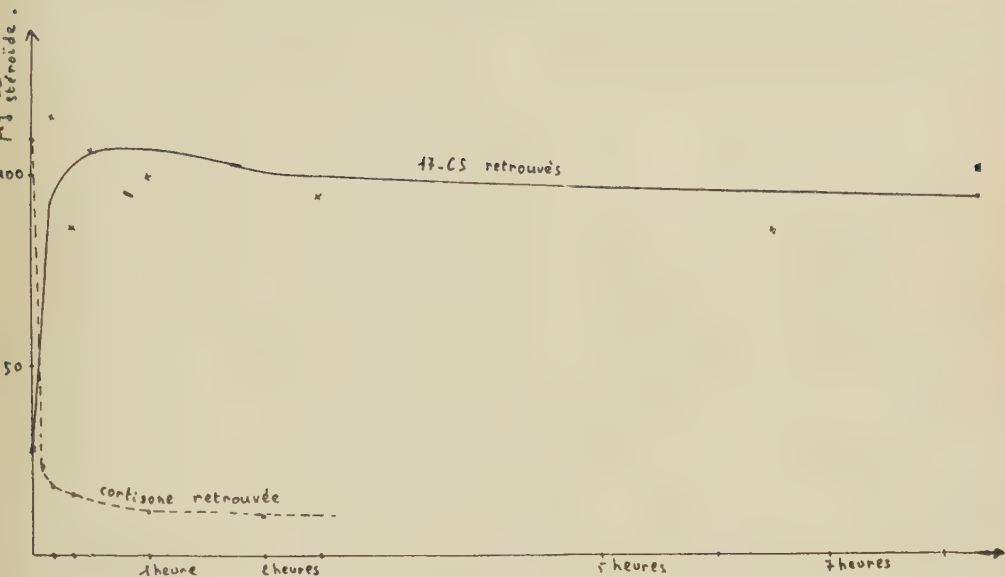


FIGURE 10
Cinétique de l'oxydation de la cortisone.

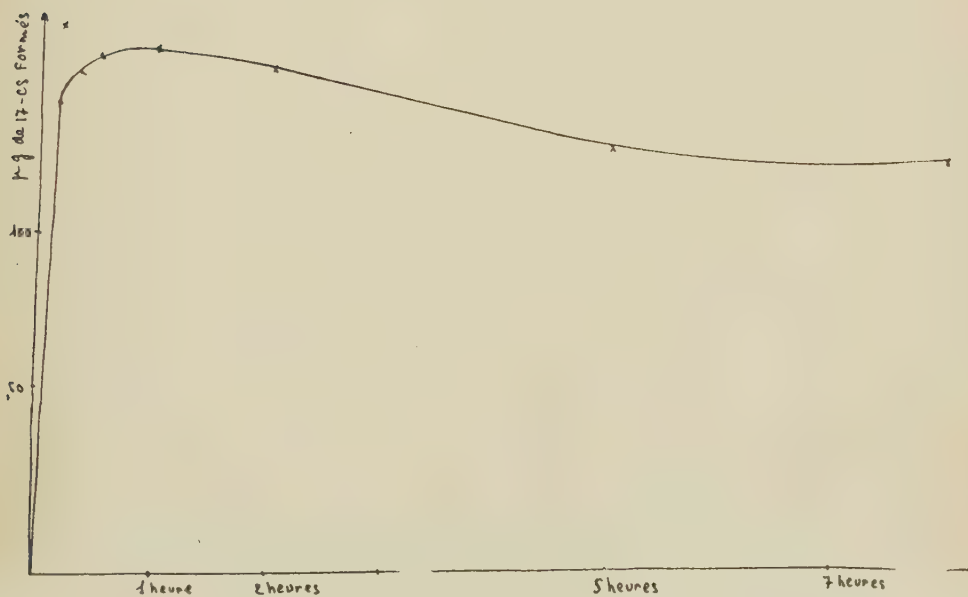


FIGURE 11
Cinétique de l'oxydation du cortisol.

Le taux des 17-CS formés évalué par la réaction de Zimmermann passe par un maximum entre 20 minutes et 1 heure, puis décroît légèrement pendant plusieurs heures, pour atteindre au bout de 5 heures une valeur qui semble relativement stable.

En fait, les dosages pratiqués sur des solutions pures de cortisone permettent de retrouver, avec une durée d'oxydation de 20 à 30 minutes environ 105 % de la quantité théorique de cortisone, et avec une durée d'oxydation de 5 heures, environ 95 % de cette quantité théorique. Nous reviendrons sur ces faits lors de la discussion de nos résultats.

OXYDATION BISMUTHIQUE DES EXTRAITS URINAIRES

Après avoir étudié l'action du bismuthate sur la cortisone et le cortisol, nous avons voulu étudier cette action sur des stéroïdes extraits d'urines, dont la structure différente (noyau A saturé en particulier) pourrait entraîner des modifications des propriétés réactionnelles.

Obtention d'un extrait urinaire.

L'extrait urinaire a été obtenu à partir d'un mélange à parties égales de 4 urines différentes, dont les stéroïdes ont été extraits sous forme conjuguée par la méthode de Kellie (19-5) et repris par 20 cm³ d'eau distillée.

Etude de l'oxydation de cet extrait.

La solution obtenue contient une quantité importante de 17-CS, et par conséquent, le dosage des 17-CS après oxydation bismuthique n'atteint pas de façon précise les 17-CS résultant de cette oxydation. Nous avons éliminé les 17-CS par le borohydrure de sodium, avant de réaliser l'oxydation, de la manière suivante : 5 cm³ d'extrait urinaire en solution aqueuse, additionnés de 35 cm³ d'eau distillée sont abandonnés une nuit avec 200 mg de borohydrure de sodium. Le mélange est ensuite additionné de 40 cm³ d'acide acétique pur et 10 g de bismuthate, après un prélèvement de 8 cm³ du mélange acidifié (témoin avant oxydation). D'autres prélèvements de 8 cm³ sont faits à des temps variant de 10 minutes à 8 heures. Chaque fraction est immédiatement traitée comme un dosage urinaire l'est après l'oxydation.

Les résultats sont représentés dans la courbe de la figure 12.



FIGURE 12
Cinétique de l'oxydation d'un extrait urinaire.

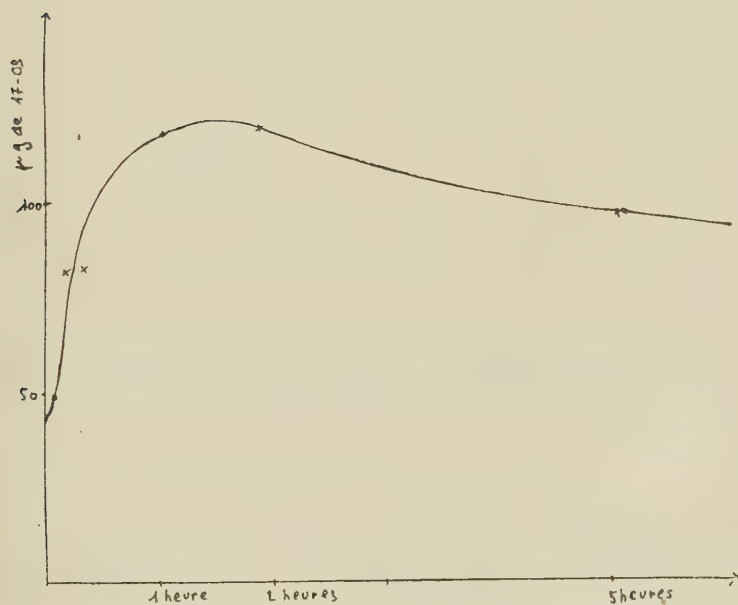


FIGURE 13
Cinétique de l'oxydation d'une urine.

ACTION DU BISMUTHATE EN MILIEU URINAIRE

La courbe de la figure 13 représente la cinétique de l'action du bismuthate sur une urine. Les points de la courbe ont été obtenus en faisant varier le temps d'oxydation dans des dosages de 17-KGS totaux effectués sur cette urine.

ACTION DU BISMUTHATE SUR LES FONCTIONS HYDROXYLÉES EN 3 ET EN 20

On pourrait craindre que l'oxydation de ces fonctions conduise à des cétones qui, comme nous l'avons déjà dit, sont faiblement chromogènes en réaction de Zimmermann. Nous avons donc soumis du prénandiol (dihydroxy-3 α , 20 α -prégnane) en solution aqueuse aux opérations d'un dosage de 17-KGS, avec des temps d'oxydation de 30 minutes et de 5 heures. Il ne se forme pas de cétones décelables en réaction de Zimmermann, dans un cas ni dans l'autre.

RÉSUMÉ DE L'ACTION DU BISMUTHATE

Le bismuthate oxyde régulièrement la cortisone en adrénostérone, et le cortisol en hydroxy-11 β -androstène-dione et un peu d'adrénostérone, avec des rendements à peu près quantitatifs lorsque le substrat est correctement solubilisé. La réaction évolue très rapidement dans les 30 premières minutes, puis décroît légèrement entre 1 heure et 5 heures.

Le bismuthate oxyde de même les stéroïdes urinaires en 17-CS correspondants, aussi bien en milieu pur qu'en milieu urinaire.

L'oxydation respecte le noyau stéroïde, et en particulier, n'oxyde pas les fonctions hydroxylées en 3, comme celle du prénandiol.

IV. Etude de la réaction au borohydrure-bismuthate

Ayant étudié séparément l'action du borohydrure, puis celle du bismuthate sur les stéroïdes purs, nous avons été amenés à étudier de même les transformations apportées aux stéroïdes par l'enchaînement des deux réactions, dans les conditions où elles sont mises en œuvre lors du dosage des 17-OH CS.

ACTION QUALITATIVE SUR LES STEROIDES PURS

Conditions des réactions.

5 cm³ de solutions à 200 µg/cm³ (soit 1 mg de stéroïde) de cortisone et de cortisol sont évaporés à sec, et le résidu repris par 20 cm³ de butanol tertiaire aqueux à 80 % v/v. La solution obtenue est alors traitée comme l'est l'urine dans le dosage des 17-OH CS, en multipliant par 5 les doses de chaque réactif afin d'en respecter les proportions. Le résidu final est repris par 0,8 cm³ d'éthanol absolu, comme dans l'étude de l'action qualitative du bismuthate, et pour les mêmes raisons.

Techniques d'étude des produits formés.

Les produits de la réaction ont été séparés par chromatographie sur papier, selon les techniques décrites précédemment. Les réactions colorées mises en œuvre pour révéler les chromatogrammes sont aussi celles qui sont citées plus haut.

Résultats obtenus.

Nous avons, pour chacun des deux stéroïdes étudiés, retrouvé sur tous nos chromatogrammes deux spots de faible intensité que leur mobilité (rigoureusement identique à celle des témoins correspondants dans le système benzène-hexane-propane-diol) et leur réactivité nous conduisent à identifier à l'adrénostérone et à l'hydroxy-11 β-androstène-dione. Nous n'avons retrouvé aucun spot réagissant au bleu de tétrazo-

lium. En outre, et pour les deux stéroïdes, nous avons retrouvé sur certains chromatogrammes des traces d'un corps resté sur la ligne de départ, non révélé en lumière ultra-violet à 240 m μ , révélé par la réaction de Zimmermann, non révélé par les autres réactions colorées.

Essai d'appréciation quantitative.

Comme dans les chromatographies décrites plus haut, nous avons déposé des volumes de solutions en expérience et de solutions témoins où nous pensions retrouver une dizaine de microgrammes de stéroïdes. Or, tous les spots que nous avons décrits, provenant des solutions en expérience, ont une surface et une intensité de coloration très faibles, correspondant au plus à quelques microgrammes de stéroïde pour chaque spot. Nous estimons que la totalité des stéroïdes ainsi retrouvés correspond environ à 5 microgrammes de 17-CS, soit la moitié de la quantité attendue.

Conclusions.

Nous avons mis en évidence la formation de petites quantités d'adrénostérone et d'hydroxy-11 β -androstène-dione, à partir de la cortisone comme du cortisol, et, peut-être d'un autre stéroïde beaucoup plus polaire. Nous reviendrons sur ces faits dans la discussion, et il nous faudra aussi discuter de la disparition d'une quantité importante de stéroïde.

ACTION QUANTITATIVE SUR LES STEROIDES PURS

Conditions de la réaction.

Au début de cette étude, nous nous sommes heurtés aux difficultés déjà signalées dans l'étude de l'action du seul bismuthate sur les stéroïdes purs. Nous n'insisterons pas sur la nécessité de dissoudre les stéroïdes dans un solvant approprié, comme le butanol tertiaire, pour mener à bien la réaction.

Nous avons réalisé l'expérience sur des prises d'essai de 100 microgrammes de cortisol et de cortisone en solution dans 4 cm³ de butanol tertiaire aqueux à 80 % v/v. Le dosage a été mené selon la technique de dosage des 17-OH CS.

Résultats obtenus.

Ces résultats sont plus satisfaisants que ne le laissait craindre l'évaluation quantitative sur nos chromatogrammes.

Il ne sont cependant pas rigoureusement théoriques : on retrouve 65 % du cortisol, et 71 % de la cortisone, exprimés en mg de trans-déhydro-androstérone il est vrai.

Conclusions.

L'expérience réalisée en tube avec précision aboutit à des résultats plus satisfaisants que l'évaluation approximative de la surface et de l'intensité des taches sur les chromatogrammes. Il reste cependant un léger écart au chiffre théorique que nous serons amenés à discuter.

ACTION SUR LES EXTRAITS URINAIRES

Ne disposant pas d'un extrait urinaire rigoureusement titré en stéroïdes purs, nous n'avons pas pu déterminer avec précision le pourcentage de récupération que la méthode permet d'atteindre. Cependant, au cours de l'étude de l'action du bismuthate sur les extraits urinaires, les résultats obtenus en dosant les 17-KGS par différence 17-KGS totaux — 17-CS n'étaient reproductibles qu'avec fort peu de précision. Par contre, après l'élimination des 17-CS par le borohydrure de sodium, les résultats obtenus deviennent très reproductibles. Nous pensons donc que l'emploi du borohydrure de sodium a au moins l'avantage d'améliorer sensiblement la précision des dosages.

V. Etude des causes d'erreurs

QUALITÉ DES RÉACTIFS

Borohydrure de sodium.

Le borohydrure de sodium est hygroscopique, il doit par conséquent être conservé en flacons bouchés hermétiquement. Nous avons pu constater une légère baisse de l'activité du produit lorsque celui-ci s'est hydraté, et la réduction des 17-CS peut alors être incomplète.

Bismuthate de sodium.

DICZFALLUZY et coll. (18) ont déjà montré l'importance de la qualité de ce réactif. Dans les conditions où nous opérons, l'oxydation nous a toujours paru satisfaisante. Il est évident que de toutes façons la quantité de bismuthate employée et la durée de l'oxydation devront être fixées par l'expérience, selon la qualité du produit utilisé.

EXISTENCE D'UNE GLYCOSURIE IMPORTANTE

Même avec un bismuthate de bonne qualité, l'oxydation peut ne pas être complète s'il y a dans l'urine une substance réductrice capable de consommer ce réactif. Théoriquement, de nombreux corps réducteurs pourraient intervenir, des médicaments par exemple, ou la vitamine C. En fait, de tels corps se trouvent généralement dans l'urine en quantités trop faibles pour fausser les dosages. Par contre, il est un réducteur qui peut être éliminé de façon massive par les urines : c'est le glucose.

Consommation du bismuthate par le glucose en solution pure.

Nous avons dosé le bismuthate de sodium par la méthode décrite précédemment, après contact avec une solution aqueuse de glucose en milieu acétique à 50 %. Nous trouvons que 0,25 g de glucose suffisent dans ces conditions à faire disparaître complètement et rapidement le pouvoir oxydant de un g de bismuthate. Donc, lors d'un dosage selon notre tech-

nique, une urine contenant 60 g de glucose par litre détruirait complètement et presque immédiatement tout le bismuthate qui lui est ajouté. Il est certain qu'une glycosurie bien plus faible, si elle ne suffit pas à détruire entièrement le bismuthate, en altère encore une fraction importante et modifie profondément les conditions de la réaction.

Résultats des dosages chez les diabétiques.

Les faits ainsi établis sont vérifiés par les dosages que nous avons effectués sur des urines contenant du glucose. Les résultats obtenus paraissent trop faibles, et on trouve un taux de stéroïdes plus élevé si on utilise une quantité de bismuthate plus grande.

Solutions à apporter.

L'utilisation d'un plus grand excès de bismuthate constitue le moyen le plus simple de tourner la difficulté. Deux autres solutions peuvent être envisagées selon SOBEL (59) : soit éliminer le glucose par fermentation, soit extraire les stéroïdes sous forme conjuguée selon la technique de EDWARDS et KELLIE (19-5). C'est cette dernière solution qui est conseillée par SOBEL.

AUTRES CAUSES D'ERREURS

D'autres causes d'erreurs, moins spécifiquement inhérentes à la méthode, peuvent intervenir.

Élimination urinaire de produits chromogènes en réaction de Zimmermann.

Un certain nombre de médicaments, notamment, sont susceptibles d'être éliminés par les urines, d'où ils sont extraits en même temps que les stéroïdes, et donnent ensuite avec le réactif de Zimmermann des colorations variées.

L'oxydation bismuthique a l'avantage de détruire un certain nombre de ces corps parasites. Néanmoins, certains peuvent lui résister ; dans tous les cas, de tels corps susceptibles de fausser le dosage des 17-CS faussent par contre-coup la détermination par différence des 17-KGS. Par exemple, SALVESEN et coll. (52) signalent que le méprobamate développe une coloration parasite en réaction de Zimmermann.

Pour éviter de telles erreurs, il est recommandé d'éviter autant que possible toute thérapeutique médicamenteuse pendant les quelques jours qui précèdent les dosages.

Récolte des urines.

Diverses erreurs matérielles sont susceptibles d'intervenir. En particulier, dans certains cas il est difficile de recueillir intégralement les urines de 24 heures. Comme, en fait, le taux par litre n'est pas significatif en soi, il est indispensable pour exprimer le résultat en élimination par 24 heures de connaître la diurèse exacte d'une part, et de procéder à l'analyse sur un échantillon moyen de la totalité des urines de 24 heures.

CONCLUSIONS

Si l'on fait abstraction des erreurs matérielles, et de celles que peut introduire dans l'interprétation des résultats un prélèvement défectueux des urines, il y a deux groupes de causes d'erreurs inhérentes à la méthode :

- présence dans l'urine de sucres réducteurs.
- présence dans l'urine de corps colorés solubles dans le dichloro-éthane, ou donnant des dérivés colorés en réaction de Zimmermann.

En fait, le glucose présente de telles analogies avec la chaîne latérale des stéroïdes qu'il est susceptible de fausser leur dosage quelle que soit la méthode employée.

Quant aux corps colorés qui faussent la réaction de Zimmermann, ce sont souvent des produits cétoniques qui interfèrent dans la plupart des dosages des stéroïdes. Enfin, les pigments susceptibles d'être extraits de l'urine provoquent moins d'erreurs dans la méthode de Norymberski que dans toute autre, puisqu'ils sont presque toujours détruits par le bismuthate de sodium.

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Discussion

ACTION DU BISMUTHATE SUR LES STEROIDES PURS

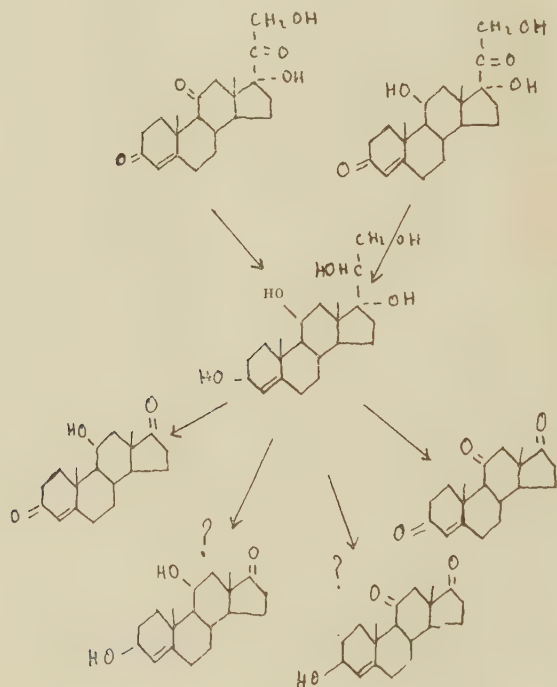
Nous avons observé que la cortisone est oxydée quantitativement en adrénostérone. Ce fait avait déjà été rapporté par BROOKS et NORIMBERSKI (10). Quant au cortisol, il conduit par oxydation bismuthique en majeure partie à l'hydroxy-11 β -androstène-dione, et aussi à une quantité notable d'adrénostérone ; NORIMBERSKI et BROOKS (10) n'ont jamais observé d'action du bismuthate sur les substituants du noyau, et ont obtenu la seule hydroxy-11 β -androstène-dione par oxydation du cortisol. Nous sommes donc sur ce point en désaccord avec les auteurs, puisque la formation d'adrénostérone à partir du cortisol implique l'oxydation de la fonction hydroxylée en 11. En fait, en 5 heures, il ne se forme que très partiellement de l'adrénostérone. Il est donc probable que l'oxydation de la fonction hydroxylée en 11 est très lente, et il se pourrait que NORIMBERSKI n'ait jamais obtenu cette oxydation à cause du temps de réaction beaucoup plus court qu'il a employé (30 minutes). Nous reviendrons plus loin sur le temps de 5 heures, pour indiquer les raisons qui nous l'ont fait choisir. D'autre part, il semble que NORIMBERSKI a travaillé sur des quantités de stéroïdes beaucoup plus importantes que nous et n'a pas eu recours aux méthodes analytiques de recherche et de caractérisation de corps obtenus en petites quantités. En particulier, nous n'avons trouvé mention dans aucun de ses travaux d'éventuelles chromatographies sur papier ; il se peut que cette différence de méthodes de travail explique la divergence des résultats obtenus.

ACTION DU BOROHYDRURE-BISMUTHATE SUR LES STEROIDES PURS

L'enchaînement des réactions au borohydrure et au bismuthate aboutit, tant à partir du cortisol qu'à partir de la cortisone, à un mélange d'adrénostérone, d'hydroxy-11 β -androstène-dione, et d'un stéroïde beaucoup plus polaire.

Or, nous avons vérifié que le borohydrure de sodium réduit toutes les fonctions cétones des molécules stéroïdes, comme l'ont montré APPLEBY et coll. (1).

Il doit donc se former au cours de la réduction du cortisol ou de la cortisone un dérivé du prégnène-4 hydroxylé en 3,11,17,20, et 21. Il faut admettre alors que, contrairement à ce que disent BROOKS et NORBYMSKI, mais comme le montrent nos expériences d'oxydation du cortisol, le bismuthate agit aussi sur les fonctions hydroxylées du noyau stéroïde. On s'expliquerait ainsi la formation d'adrénostérone et d'hydroxy-11-androstène-dione. Le stéroïde plus polaire que nous avons trouvé sur nos chromatogrammes n'est pas révélé à 240 millimicrons : il ne doit donc pas posséder le groupement Δ^4 -3-cétone. Nous ne l'avons pas identifié, mais nous pensons qu'il pourrait théoriquement être dérivé du 17-céto-androstène-4 dihydroxylé en 3 et 11, ou cétone en 11 3-hydroxylé (voir figure).



En fait, ce dernier corps nous paraît peu probable car il semble qu'il devrait avoir une polarité du même ordre que celle de l'hydroxy-11 β -dicéto-3,17-androstène-4, ce qui n'est

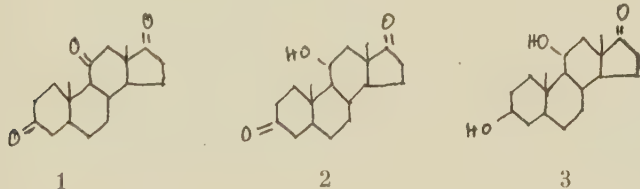
pas le cas, et que sa formation serait contraire à l'ordre habituel des oxydations en série stéroïde.

L'hypothèse de la formation à partir du cortisol ou de la cortisone d'adrénostérone, d'hydroxy-11-dicéto-androstène, et de dihydroxy-3,11-one-17-androstène expliquerait les résultats de nos études quantitatives.

L'oxydation en dérivés cétoniques (hydroxy-11-androstène-dione ou adrénostérone) dont le comportement en réaction de Zimmermann est voisin de celui de la trans-déhydro-androstérone aboutit à des résultats très satisfaisants (cas de l'action du bismuthate seul sur la cortisone ou le cortisol). Le fait que en 30 minutes on retrouve plus que la quantité théorique de cortisone serait dû à l'équivalent coloré de l'adrénostérone supérieur à celui de la trans-déhydro-androstérone. Le fait que en 5 heures on en retrouve un peu moins semble impliquer une légère destruction du noyau stéroïde à la longue.

Dans le cas de la réaction au borohydrure-bismuthate, il se formerait aussi un stéroïde dihydroxylé qui est probablement moins intensément chromogène en réaction de Zimmermann : on sait que la fonction cétonique en 3 intervient pour une part dans la réaction de Zimmermann. On comprendrait que les résultats paraissent alors trop faibles.

Dans le cas des stéroïdes urinaires (dont le noyau A est presque toujours saturé), on est amené à penser que les corps prédominants après oxydation bismuthique doivent être les suivants :



Nous ne connaissons par leur comportement en réaction de Zimmermann. On peut imaginer en tout cas que le corps n° 3 développe une coloration relativement peu intense, par exemple, car il ne possède qu'une fonction cétonique, dont aucun système de double-liaison conjuguée n'est susceptible d'exalter les propriétés réactionnelles. La formation de tels corps peu chromogènes est probablement la cause d'erreurs par défaut, erreurs dont les limites sont les mêmes que celles des variations des équivalents colorés des divers 17-CS.

TECHNIQUE PROPOSÉE

En nous basant sur les faits que nous avons vérifiés, nous pouvons discuter point par point les modalités techniques des dosages.

Les cinétiques que nous avons établies pour cette réaction montrent que la réduction au borohydrure est complète en trente minutes, et que le résultat obtenu à ce moment reste stable pendant plusieurs heures. En conséquence, nous avons conservé la durée de réduction d'une nuit préconisée par APPLEBY et coll. (1) ; nous admettons cependant qu'un temps de réaction de une heure, qui est celui qu'a adopté SOBEL (59), serait suffisant.

Pour l'oxydation bismuthique, le milieu acétique préconisé par NORYMBERSKI nous a donné satisfaction, et nous n'avons pas jugé utile d'en changer, bien que EDWARDS et KELLIE (20) estiment obtenir de meilleurs résultats en utilisant pour acidifier le milieu des acides acétiques chloro-substitués (acide trichloracétique de préférence).

Les proportions de bismuthate indiquées par NORYMBERSKI (1 g pour 4 cm³) sont suffisantes, du moins avec le bismuthate que nous avons employé, sauf en cas de glycosurie importante.

Le temps d'oxydation nous paraît beaucoup plus discutable. Le taux des 17-CS formés s'élève très rapidement pendant les trente premières minutes d'oxydation, mais le palier obtenu à ce moment dans l'oxydation du cortisol et de la cortisone est de courte durée ; quant à l'oxydation des stéroïdes urinaires, elle se poursuit encore avec formation de 17-CS pendant plusieurs heures. Nous préférons réaliser l'oxydation en 5 heures : les variations du taux de 17-CS formés en fonction du temps de réaction sont beaucoup plus faibles aux environs de cinq heures, quelle que soit la cinétique considérée.

Dans la technique d'Appleby-Norymberski, l'excès de bismuthate est réduit par une solution aqueuse de métabisulfite de sodium, après quoi le mélange est traité par l'acide chlorhydrique à chaud. EDWARDS et KELLIE (20, 34) estiment que ce temps est superflu, les glycuronides (qui représentent la forme majeure de conjugaison des stéroïdes) ayant déjà été hydrolysés par l'oxydation. En fait, si la proportion des sulfo-conjugués est faible, elle n'est pas constante. Nous préférons donc maintenir le traitement par l'acide chlorhydrique à chaud, qui a en outre l'avantage de solubiliser les sels de bismuthyle dérivés de l'oxydant en excès, et permet ainsi de

réaliser l'extraction des stéroïdes à partir d'une phase liquide homogène.

Nous avons effectué l'extraction des 17-CS formés par le dichloréthane, selon NORYMBERSKI. Ce solvant nous a toujours donné satisfaction, et nous avons vérifié qu'il extrait quantitativement les 17-CS. Nous avons dit que divers solvants organiques ont été employés par les différents auteurs. Il semble que, dans les conditions où l'on se trouve, la plupart des solvants organiques réalisent une bonne extraction des stéroïdes.

Une partie aliquote de l'extrait est évaporée et sert au dosage des 17-CS formés, par la réaction de Zimmermann. L'extrait obtenu après oxydation bismuthique est généralement privé de la plupart des pigments urinaires parasites, ce qui permet d'adopter une technique simple de réaction de Zimmermann. En particulier, la purification du produit coloré par la technique de CAHEN et SALTER (passage dans le chloroforme), ou la mesure de densités optiques « corrigées » ne sont pas indispensables. Nous avons donc retenu une modalité extrêmement simple de réaction de Zimmermann, avec lecture à l'électro-photomètre de MEUNIER.

Importance du choix de l'étalon.

Nous avons fait les étalonnages avec de la trans-déhydro-androstérone.

Certains auteurs ont employé l'androstérone comme étalon. De toutes manières, androstérone et trans-déhydro-androstérone se comportent de façon presque identique en réaction de Zimmermann. Il n'en est pas de même pour tous les 17-CS. Diverses fonctions cétoniques de la molécule stéroïde sont susceptibles de réagir, et leurs pouvoirs chromogènes s'additionnent (40 bis). Les 17-CS peuvent avoir une réactivité fortement augmentée par la présence d'autres fonctions cétoniques. La fonction cétone en 3 confère à la cortisone et au cortisol une légère réactivité. Le tableau suivant donne les pouvoirs chromogènes molaires de quelques stéroïdes selon différents auteurs, et ceux que nous avons trouvés, par rapport à la base de 100 pour la trans-déhydro-androstérone :

	Résultats		
	Norymberski	Kellie	personnels
hydroxy-3-dicéto-11,17-androstane-5	124	—	—
dihydroxy-3,11-one-17-androstane-5	85	—	—
hydroxy-11-dicéto-3,17-androstane-4	85	—	95
adrénostérone	111	—	133
cortisone	15	25	29
cortisol	18	19	11

PESEZ et HERBAIN (40 bis) ont montré que les fonctions cétones en 17 et les fonctions cétones en 3 des stéroïdes saturés ont une réactivité intense, la fonction cétone en 3 des stéroïdes 4-5 insaturés ayant une réactivité plus faible.

On s'expliquerait ainsi que la réaction au borohydrure-bismuthate appliquée au cortisol et à la cortisone ne permette pas de retrouver la quantité théorique de stéroïde : s'il se forme un peu d'adrénostérone à pouvoir chromogène élevé, il se forme aussi des dérivés dont le pouvoir chromogène est beaucoup plus faible (hydroxy-11-dicéto-3,17-androstène notamment). La même réaction, appliquée aux stéroïdes urinaires devrait aboutir à un mélange de dérivés cétoniques et hydroxylés de l'androstane, dont les pouvoirs chromogènes sont variables. La trans-déhydro-androstérone (ou l'androstérone), ayant un pouvoir chromogène intermédiaire entre ceux des divers 17-CS susceptibles de se former semble donc être l'étalon le mieux adapté.

Interférences possibles de corps colorés présents dans l'urine.

L'évaluation colorimétrique des 17-CS peut être faussée par la présence de corps colorés que nous classerons en trois groupes :

— Corps colorés solubles dans les solvants organiques, mais détruits par le bismuthate de sodium. Ce cas est probablement le plus fréquent : nous avons souvent constaté que des urines à partir desquelles l'extraction des 17-CS donnait un résidu fortement pigmenté conduisaient, après oxydation bismuthique, à un extrait pratiquement incolore. La coloration parasite ne fausse pas le dosage des 17-OH CS, mais fausse le dosage des 17-CS et l'évaluation différentielle des 17-KGS.

— Corps colorés solubles dans les solvants organiques et résistant à l'oxydation bismuthique.

— Corps développant une réaction colorée avec le réactif de Zimmermann après traitement par le bismuthate de sodium. Le méta-dinitro-benzène alcalin étant un réactif général des cétones à groupement méthylénique, il peut se trouver dans l'extrait obtenu après l'oxydation des cétones non stéroïdes capables de développer avec ce réactif une certaine coloration.

De tels pigments parasites sont souvent d'origine médicamenteuse.

SALVESEN et coll. (52) ont indiqué récemment que des sujets traités par le méprobamate éliminent dans leurs urines des corps qui développent en réaction de Zimmermann une coloration dont le spectre est légèrement différent de celui de la réaction des 17-CS ; les auteurs utilisant pour leurs dosages la lecture à plusieurs longueurs d'onde et l'application d'une formule de correction de la densité optique ont observé des erreurs par défaut dans leurs résultats, dues à l'augmentation anormale de la densité optique au voisinage du maximum d'absorption de la réaction de Zimmermann. Nous avons personnellement remarqué que des malades consommant des laxatifs à base de phénol-phtaléine éliminaient ce corps dans les urines : au cours du lavage des extraits par la soude, on voit apparaître une coloration rouge dans la phase alcaline. Nous pensons cependant que les lavages sodiques éliminent alors la phtaléine, et que les résultats ne sont pas modifiés. Il est probable que bien d'autres produits risquent de perturber les dosages par la coloration de leurs métabolites urinaires, mais nos connaissances actuelles de ces causes d'erreurs ne sont encore que fragmentaires.

Valeur et intérêt de la méthode de Norymberski.

L'étude statistique de nos résultats (pages 35-38) apporte une vue d'ensemble sur la valeur de la méthode. Nous avons développé une technique inspirée de celle d'Appleby-Norymberski dont la mise en œuvre ne présente pas de difficultés techniques particulières, et n'exige qu'un appareillage simple dont peuvent disposer tous les laboratoires : en particulier, la fin colorimétrique du dosage n'exige pas l'emploi d'un spectrophotomètre, et peut être menée à bien avec un électro-photomètre de modèle courant.

Si les résultats que nous obtenons sont généralement parallèles aux taux trouvés par la méthode de Porter et Silber, le sens à donner à d'éventuelles discordances constitue probablement l'apport le plus important de la méthode dans l'exploration de la fonction surrénalienne. En effet :

— la réaction de Porter ne dose parmi les métabolites du cortisol que le cortisol lui-même, la cortisone, et leurs dérivés di- et tétra-hydrogénés ;

— la méthode d'Appleby-Norymberski dose tous ces corps, et en plus, les dérivés hexa-hydrogénés physiologiques, ainsi que le tri-hydroxy-3,17,20-prégnane et le tri-hydroxy-3,17,20-one-11-prégnane, produits d'un métabolisme pathologique dont l'excrétion traduit un défaut de la 21-hydroxylation.

Un taux de 17-OH CS anormalement haut par rapport au taux de Porter et Silber fera suspecter l'élimination de l'un de ces derniers corps.

Inversement, un taux de 17-OH CS anormalement bas par rapport au taux de Porter fera suspecter un trouble du catabolisme des corticostéroïdes avec prédominance des formes d'élimination peu hydrogénées.

L'étude dans ce sens de l'interprétation des résultats nous paraît mériter de retenir l'attention, et susceptible d'être complétée par des travaux ultérieurs.

Conclusions

Nous présentons les différents travaux effectués par NORYMBERSKI et ses collaborateurs, utilisant pour le dosage des 17-hydroxy-corticostéroïdes urinaires une oxydation par le bismuthate de sodium. Nous retenons une technique très proche de celle de APPLEBY et NORYMBERSKI.

Une étude statistique comparée portant sur plus de 400 dosages urinaires nous permet de conclure que les taux trouvés sont en rapport avec les taux de chromogènes Porter et Silber ; les variations éventuelles de ce rapport sont d'ailleurs importantes à considérer, car elles reflètent une modification dans le catabolisme des hormones stéroïdes.

Du point de vue chimique, nous avons voulu analyser l'action de chacun des réactifs employés. En ce qui concerne le borohydrure de sodium, la vitesse de réduction des trois principales fonctions cétoniques (en 3, 17 et 20) est telle que la durée de la réaction pourrait sans inconvénient être ramenée à une heure.

Pour l'oxydation bismuthique, nous précisons certaines des conditions indispensables à son déroulement quantitatif : nécessité d'opérer sur des stéroïdes dissous dans un solvant convenablement choisi. Nous donnons la cinétique de l'oxydation de la cortisone et du cortisol en solutions pures, et des stéroïdes urinaires. Ces cinétiques nous amènent à fixer un temps de réaction de cinq heures pour les dosages.

Qualitativement, nous montrons que la cortisone est oxydée en adrénostérone et que le cortisol est oxydé en majeure partie en hydroxy-11-dicéto-3,17-androstène ; dans ce dernier cas, il se forme également un peu d'adrénostérone, ce qui permet de supposer que le bismuthate peut à la longue oxyder la fonction hydroxylée en 11. Nous montrons par ailleurs que le bismuthate est, dans ces conditions, sans action sur la fonction hydroxylée en 3 du prégnandiol.

L'enchaînement des réactions au borohydrure et au bismuthate s'applique à la cortisone et au cortisol avec formation dans les deux cas d'un mélange d'adrénostérone et d'hydroxy-11 β -dicéto-3,17-androstène-4. Ceci laisse supposer que le borohydrure de sodium réduit la fonction cétonique en 11 de la cortisone, aboutissant au penta-hydroxy-3,11,17,20,21-prégnène-4, aussi bien à partir de la cortisone qu'à

partir du cortisol ; ce corps traité par le bismuthate subit la rupture oxydative avec formation d'un 17-cétostéroïde. Au moins pour une part, le dihydroxy-3,11-one-17-androstène-4 formé est réoxydé en adrénostérone ou en hydroxy-11 β -dicéto-3,17-androstène-4. Il est possible aussi qu'une partie de ce composé reste sous sa forme dihydroxylée.

Quantitativement, le rendement de la réaction au borohydrure-bismuthate est de 65 % pour le cortisol, de 71 % pour la cortisone. Nous pensons que l'écart entre les résultats théoriques et les résultats trouvés est dû aux différences notables des équivalents colorés de la trans-déhydro-androstérone d'une part, de l'hydroxy-11-androstène-dione et peut-être du dérivé dihydroxylé formé d'autre part. En fait, comme les stéroïdes formés au cours des dosages urinaires ne sont jamais la trans-déhydro-androstérone (ni l'androstérone) utilisée pour les étalonnages, les différences d'équivalents colorés des chromogènes Zimmermann constituent la cause d'une erreur certaine, bien que relativement faible.

Nous avons envisagé d'autres causes d'erreurs : la présence de glucose en forte quantité, consommant du bismuthate, perturbe l'oxydation des stéroïdes ; on sera amené dans ce cas à modifier la dose de bismuthate employée, ou à faire le dosage des stéroïdes préalablement extraits par la méthode de Kellie. Divers médicaments peuvent aussi fausser les dosages ; on a signalé les erreurs dues au méprobamate, mais il est certain que bien d'autres corps pourraient intervenir de façon analogue.

En définitive, nous pensons que les erreurs sont assez rares, probablement moins fréquentes que dans la plupart des méthodes de dosage des 17-OH CS. Par ailleurs, la méthode de Norymberski présente de nombreux avantages :

— simplicité technique, tant dans les manipulations que dans l'appareillage indispensable,

— résultats reproductibles et sûrs dans l'ensemble,

— taux trouvés très significatifs, puisque représentant tous les métabolites d'un groupe homogène d'hormones : cortisol et ses précurseurs.

Le Doyen,
H. HERMANN

Le Président de la Thèse,
A. BADINAND

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 1^{er} Juin 1960.

Pour le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
Le Vice-Président : A. BRUHL.

Bibliographie

1. APPLEBY (J. I.), GIBSON (G.), NORYMBERSKI (J. K.), STUBBS (R. D.). — Indirect analysis of corticostéroïds. I. The determination of 17-hydroxy-corticosteroïds. *Biochem. J.*, 1955, **60**, 453-459.
2. APPLEBY (J. I.), NORYMBERSKI (J. K.). — Indirect analysis of corticosteroïds. II. The determination and identification of urinary 17-hydroxy-20-oxo-steroïds unsubstitued at C₂₁. *Biochem. J.*, 1955, **60**, 460-467.
3. BADINAND (A.), REVOL (A.). — Spécificité des réactions analytiques des stéroïdes en C₂₁. *Biologie médicale*, 1958, **47**, 161-180.
4. BADINAND (A.), REVOL (A.), BURLET (J. M.). — Intérêt de deux réactifs, borohydrure et bismuthate de sodium, dans l'analyse des corticostéroïdes. *Bulletin des Travaux de la Société de Pharmacie de Lyon*, 1959, **3**, 81-86.
5. BARLOW (J. J.), KELLIE (A. E.). — A quantitative method for the chromatographic separation of 17-oxo-steroïd sulphates from 17-oxo-steroïd glucuronides : with observations on the behaviour of conjugated corticosteroïds on the same system. *Biochem. J.*, 1959, **71**, 86-91.
6. BARTOS (J.). — Sur l'analyse colorimétrique des 3-cétostéroïdes à l'aide du 2,6-diterbutyl p-crésol. *Ann. Pharm. Franç.*, 1959, **17**, 141-144.
7. BAULIEU (E. E.), WEINMANN (S. H.), JAYLE (M. F.). — Analyse des 17-cétostéroïdes neutres urinaires. Hydrolyses sélectives ; identification et estimation par chromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **39**, 1371-1394.
8. BERNSTEIN (S.), LENHARD (R. H.). — The absorption spectra of steroïds in concentrated sulfuric acid. 1. Method and data. *J. Org. Chem.*, 1953, **18**, 1146-1165.
2. Structural correlations. Analysis of the 220-300 m μ region. *J. Org. Chem.*, 1954, **19**/2, 1269-1277.
9. BORTH (R.), LINDER (A.), RIONDEL (A.). — Urinary excretion of 17-hydroxy-corticosteroïds and 17-ketosteroïds in healthy subjects, in relation to sex, age, body weight and height. *Acta Endocrinol.*, 1957, **25**, 33-44.
10. BROOKS (J. W.), NORYMBERSKI (J. K.). — The oxidation of corticosteroïds with sodium bismuthate. *Biochem. J.*, 1953, **55**, 371-378.
11. CASPI (E. Y.), HECHTER (O.). — Corticosteroid metabolism in liver. IV. Isolation of certain cortisol-4-C-14 metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **61**, 299-312.

12. CHAIKIN (S. W.), BROWN (W. G.). — Reduction of aldehydes, ketones and acid chlorides by sodium borohydride. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **71**/1, 122-125.
13. CHEN (C.), WHEELER (J.), TEWELL (H. E.). — Estimation of adrenal cortical steroids with tetrazolium salts. *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **42**, 749-757.
14. CHEN (P. S.). — Spectrophotometric determination of Δ 4-3-keto-steroids with salicyloyl hydrazid. Application to urinary aldosterone. *Analytical Chemistry*, 1959, **31**, 292-296.
15. DAUGHADAY (W. H.), JAFFE (H.), WILLIAMS (R. H.). — Chemical assay for « cortin ». Determination of formaldehyde liberated on oxidation with periodic acid. *J. Clin. Endocrinol.*, 1948, **8**, 166.
16. DESGREZ (P.), HAAS (J.), WEINMANN (S. H.). — Le dosage des corticoides formaldéhydiques par la méthode de diffusion et ses applications physiopathologiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1959, **71**, 5-22.
17. DICZFALLUZY (E.), PLANTIN (L. O.), BIRKE (G.), WESTMAN (A.). — Some factors influencing the estimation of urinary 17-ketogenic steroids. *Acta Endocrinol.*, 1955, **18**, 356-373.
18. DICZFALLUZY (E.), PLANTIN (L. O.), BIRKE (G.), INGALL (S. C.), NORYMBERSKI (J. K.). — The quality of sodium bismuthate as a factor affecting the determination of 17-hydroxycorticosteroids. *Acta Endocrinol.*, 1958, **27**, 275-280.
19. EDWARDS (R. W. H.), KELLIE (A. E.), WADE (A. P.). — The extraction and oxidation of urinary steroid conjugates. *Mem. Soc. Endocrin.*, 1953, n° 2, 53-63.
20. EDWARDS (R. W. H.), KELLIE (A. E.). — The determination of 17-ketogenic steroids. *Acta Endocrinol.*, 1958, **27**, 262-274.
21. FUKUSHIMA (D. K.), LEEDS (N. S.), BRADLOW (H. L.), KRITCHEVSKY (T. H.), STOKEM (M. B.), GALLAGHER (T. F.). — The characterization of four new metabolites of adrenocortical hormones. *J. Biol. Chem.*, 1955, **212**, 449-460.
22. GOLUB (O. J.), SOBEL (C.), HENRY (R. J.). — Comparative study of the 17-ketogenic (Norymberski), Glenn-Nelson and Reddy methods for the determination of C₂₁ urinary steroids. *J. Clin. End. Metab.*, 1958, **18**, 522-530.
23. GORNALL (A. G.), Mac DONALD (M. P.). — Quantitative determination of the steroid hormones with 2,4-dinitro-phenylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, 279-297.
24. HEARD (R. D. H.), SOBEL (H.). — A colorimetric method for the estimation of reducing steroids. *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, 687-699.
25. HEARD (R. D. H.), BLIGH (E. G.), CANN (M. C.), JELLINCK (P. H.), O'DONNELL (V. J.), RAD (B. G.), WEBB (J. L.). — Biogenesis of the sterols and steroid hormones. *Rec. Progress Hormone Research*, 1956, **12**, 45-71.
26. HECHTER (O.), PINCUS (G.). — Genesis of adrenocortical secretion. *Physiological Reviews*, 1954, **34**, 459-496.
27. HEIDT (L. J.), GLADDING (E. K.), PURVES (C. B.). — *Paper Tr. J.*, 1945, **121**, 35. (Cité par BROOKS et NORYMBERSKI).

28. HENRY (R.), THÉVENET (M.). — Dosage des 17-cétostéroïdes neutres totaux. Etude de la réaction de Zimmermann-Cahen et Salter. Mise au point d'une technique rapide. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1617-1634.
29. HENRY (R.), THÉVENET (M.). — Technique rapide de chromatographie des 17-cétostéroïdes neutres. *Ann. Biol. Clin.*, 1954, **12**, 65-79.
30. HERRMANN (W.), SILVERMAN (L.). — Method for determination of urinary pregnane-3- α , 17- α , 20- α -triol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, **94**, 426-428.
31. JAILER (J. W.), GOLD (J. J.), VANDE WIELE (R.), LIEBERMAN (S.). — 17- α -hydroxyprogesterone and 21-desoxyhydrocortisone: their metabolism and possible role in congenital adrenal virilism. *J. Clin. Invest.*, 1955, **34**, 1639-1646.
32. JAYLE (M. F.), CRÉPY (O.). — Evaluation des 3 α - et 3 β -stéroïdes neutres. Spécificité de leur conjugaison hépatique. *Ann. Endocrinol.*, 1953, **14**, 74-77.
33. JORGENSEN (M.). — On the determination of 17-ketogenic steroids in urine. *Acta Endocrinol.*, 1957, **25**, 424-442.
34. KELLIE (A. E.). — The determination of 17-oxosteroids (17-ketosteroids) and 17-oxogenic steroids (17-ketogenic steroids), a review. *The analyst*, 1957, **82**, 722-734.
35. LOWENSTEIN (B. E.), CORCORAN (A. L.), PAGE (I. H.). — Determination of corticosteroids in urine. *Endocrinol.*, 1946, **39**, 82.
36. LYNN (W. S.), STAPLE (E.), GURIN (S.). — The degradation of cholesterol by mammalian tissue extracts. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 4048.
37. MALASSIS (D.), BAULIEU (E. E.), WEINMANN (S.), CRÉPY (O.), JAYLE (M. F.). — *C. R. Soc. Biologie*, 9 mars 1957.
38. NORBYERSKI (J. K.), SERMIN (A. T.). — Oxidative fission of pregnandiol glucuronide. *Biochem. J.*, 1953, **55**, 876-880.
39. NORBYERSKI (J. K.), STUBBS (R. D.). — Indirect analysis of corticosteroids. III. The determination of steroidal dihydroxy-acetones. *Biochem. J.*, 1956, **64**, 168-175.
40. PESEZ (M.), ROBIN (J.). — Sur une réaction de la p-nitroso diméthylaniline. *Ann. Pharm. Franç.*, 1959, 624-626.
- 40 bis. PESEZ (M.), HERBAIN (M.). — Inégalités réactionnelles du carbonyle en série stéroïde. *Bull. Soc. Chim. France*, 1948, 104-108.
41. PINCUS (G.). — Aspects du métabolisme des stéroïdes hormonaux. *Actualités biochimiques*, 107 p., Masson, 1955.
42. PORTER (C. C.), SILBER (R. H.). — A quantitative color reaction for cortisone and related 17-21-dihydroxy-20-ketosteroids. *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 201-207.
43. PRUNTY (F. T. G.). — *Recent Progress in Hormone Research*, 1954, **9**, 317.
44. RAFTOPOULOU (R.), STAUDINGER (Hj.), WEISSBECKER (L.). — Methoden zur corticoidbestimmung im menschlichen harn. *Clin. Chim. Acta*, 1959, **4**, 463-483.
45. REICH (H.), CRANE (K. F.), SANFILIPPO (S. J.). — The reaction of steroid ketones with 2-4 dinitrophenylhydrazine. *J. Org. Chem.*, 1953, **18**, 822-832.

46. REICH (H.), SAMUELS (B. K.). — The reaction of adrenocortical hormones with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Org. Chem.*, 1956, **21**, 65-67.
47. REICHSTEIN (T.). — Über bestandteile der nebennieren-rinde zur konstitution der $C_{21}O_5$ gruppe. *Helv. Chem. Acta*, 1937, **20**, 978-992.
48. REVOL (A.), BURLET (J. M.), TISSOT (A.), PUTELAT (R.), BADINAND (A.), GUINET (P.). — Le dosage des 17α -hydroxycorticostéroïdes urinaires par la méthode de Norymberski. *Rev. Lyon. Méd.*, 1959, **8**, 949-968.
49. RIGBY (W.). — Sodium bismuthate as an oxidizing agent for organic compounds. *Nature*, 1949, **164**, 185-186.
50. RIGBY (W.). — Oxidations with sodium bismuthate: glycol fission and related reaction. *J. Chem. Soc.*, 1950, 1907-1913.
51. SABA (N.), HECHTER (O.), STONE (D.). — The conversion of cholesterol to pregnenolone in bovine adrenal homogenates. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 3862-3864.
52. SALVESEN (S.), NISSEN-MEYER (R.). — Effect of meprobamate therapy on the estimation of 17-ketosteroids and 17-ketogenic steroids. *Acta Endocrinol.*, 1958, **29**, 224-230.
53. SAVARD (K.). — Some theoretical and some practical aspects of partition chromatography of ketosteroids. *Recent Progress in Hormone Research*, 1954, **9**, 185-208.
54. SCHOLDER (R.), STOBBE (H.). — Über bismuthate. *Zeits. Anorg. Chem.*, 1941, **247**, 392-414.
55. SCHOLLER (R.), BUSIGNY (M.), JAYLE (M. F.). — Méthode de dosage des 17-21-dihydroxy-20-cétostéroïdes (17-OH-corticoïdes). *Fiche de technique biologique, Pathologie et Biologie*, 1957, n° 2.
56. SCHÜLLER (E.). — Die normalausscheidung der 17-ketogenen sterioide. *Acta Endocrinol.*, 1956, **21**, 281-288.
57. SCHÜLLER (E.). — Corticosteroid-ausscheidung in der normalen gravidität. *Acta Endocrinol.*, 1957, **25**, 345-364.
58. SILBER (R. H.), PORTER (C. C.). — The determination of 17 : 21 dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. *J. Biol. Chem.*, 1954, **210**, 923-932.
59. SOBEL (C.), GOLUB (O. J.), HENRY (R. J.), JACOBS (S. L.), BASU (G. K.). — Study of the Norymberski methods for determination of 17-ketogenic steroids (17-hydroxy-corticosteroids) in urine. *J. Clin. End. Metab.*, 1958, **18**, 208-221.
60. SOUCHAY (P.). — Mises au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique. 4^e série, p. 124. Masson, Paris, 1956.
61. TALBOT (N. B.), SALTZMAN (A. H.), WIXON (R. L.), WOLFE (J. K.). — Colorimetric assay of urinary corticosteroid-like substances. *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, 535-546.
62. TOMKINS (G.), ISSELBACHER (K. J.). — Enzymatic reduction for cortisone. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 3100-3101.
63. UMBERGER (E. J.). — Isonicotinic acid hydrazide as a reagent for determination of Δ_4 -3-ketosteroids. Determination of testosterone and progesterone propionate in oil solutions. *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 768-773.

64. UNGAR (F.), DAVIS (J. W.), ROSENKRANTZ (H.), DORFMAN (R. I.). — The metabolism of pregnane-17 -21-diol-3, 11,20-trione in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1954, **207**, 375-384.
 65. WEINMANN (S. A.), BAULIEU (E. E.), ALFSEN (A.), LISTOA (B.), JAYLE (M. F.). — *C. R. Soc. Biologie*, 9 mars 1957.
 66. WILSON (H.), FAIRBANKS (R.), KRAMER (C.). — A rapid micro-method for the determination of 17-hydroxy and 17-keto-steroids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **54**, 440-456.
 67. ZAFFARONI (A.), BURTON (R. B.), KEUTMANN (E. H.). — The application of paper partition chromatography to steroid analysis. *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 109-116.
 68. ZAFFARONI (A.). — Absorption spectra of sulfuric acid chromogens obtained from adrenal steroids and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 3828.
 69. ZAFFARONI (A.), BURTON (R. B.). — Identification of corticosteroids of beef adrenal extract by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1951,, **193**, 749-767.
 70. ZAFFARONI (A.). — Micromethod for the analysis of adrenocortical steroids. *Rec. progress hormone research*, 1953, **8**, 51-83.
-

Table des Matières

PAGES

INTRODUCTION	9
PLAN DU TRAVAIL.....	11

PREMIERE PARTIE

I. <i>La sécrétion cortico-surrénalienne</i>	15
II. <i>Réactions analytiques et méthodes de dosage des cortico-stéroïdes urinaires</i>	21

DEUXIEME PARTIE

I. <i>Les méthodes de Norymberski</i>	29
II. <i>Techniques personnellement utilisées</i>	33
III. <i>Résultats obtenus dans les dosages urinaires</i>	35

TROISIEME PARTIE

I. <i>Le borohydrure et le bismuthate de sodium</i>	45
II. <i>Etude de l'action du borohydrure</i>	49
III. <i>Etude de l'action du bismuthate</i>	55
IV. <i>Etude de la réaction au borohydrure-bismuthate</i> ..	67
V. <i>Etude des causes d'erreurs</i>	70

QUATRIEME PARTIE

<i>Discussion</i>	75
<i>Conclusions</i>	83
BIBLIOGRAPHIE	85

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX (AIN) — J. PATISSIER
